

Ministerie van de Vlaamse Gemeenschap
Departement Leefmilieu en Infrastructuur (LIN)
ADMINISTRATIE MILIEU-, NATUUR-, LAND- en WATERBEHEER (AMINAL)



Overheidsopdracht

DTG/OL200300060/3208/M&G

***Evaluatie van de luchtkwaliteit in Vlaanderen
door effectgerichte metingen
in de omgevingslucht.***

**Eindrapport
februari 2005**

Studie uitgevoerd door Vito en UG

Witters H., Van den Heuvel R., Brits E. & Schoeters G. (Vito)

Van Larebeke N., Dufour V. & Janssen C. (UG)

2005/TOX/R/011



Dit project werd gerealiseerd onder begeleiding van een stuurgroep en met hulp van meerdere personen. De onderzoekspartners zijn dank verschuldigd aan elk van hen die een actieve bijdrage hebben geleverd tot dit onderzoeksproject.

De stuurgroep met

Voorzitster: M. Mampaey (AMINAL)

En leden: D. Aerts (AMINAL), L. Casteleyn (AMINAL), N. Claeys (VMM), M. Desmedt (VMM), M. Rossier (VMM), K. Van Campenhout (AMINAL), D. Wildermeersch (Administratie Gezondheidszorg)

Andere betrokkenen die een belangrijke bijdrage leverden bij de realisatie van dit rapport:

- Verstraelen S. (Vito) en Verschaeve L. (Vito) voor tekstuele bijdragen.
- Dierckx L. (Vito) voor correcties en editiewerk.

INHOUDSTAFEL

SAMENVATTING	3
HOOFDSTUK 1	3
LUCHTVERONTREINIGING ALS PATHOGEEN AGENS.	3
1 Pathologiën met verhoogde incidentie of ernst door luchtpollutie.	3
1.1 Verstoring van de weefselstructuur van de long en van de longfunctie	3
1.2 Astma	3
1.3 COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease)	3
1.4 Interstitiële longaandoeningen	3
1.5 Atopie en allergie.....	3
1.5.1 Prevalentie	3
1.5.2 Ontstaansmechanismen van allergische reacties.	3
1.6 Auto-immuunziekten.....	3
1.6.1 Soorten auto-immunreacties	3
1.6.2 Milieufactoren bij auto-immuunziekten	3
1.7 Kanker.....	3
1.8 Nierziekten	3
1.8.1 Ontstaansmechanismen chemisch geïnduceerde nierinsufficiëntie.	3
1.8.2 Vroegtijdige merkers van nierbeschadiging.	3
1.8.3 Nierinsufficiëntie door blootstelling zware metalen via de omgeving.....	3
1.9 Geslachtsziekten	3
1.9.1 Mannelijke infertiliteit.....	3
1.9.2 Vrouwelijke infertiliteit.....	3
1.9.3 Erectiele dysfunctie	3
1.9.4 Vertraging intra-uteriene groei en inductie van spontane abortus	3
1.9.5 Sex ratio	3
1.10 Congenitale afwijkingen en prenatale ontwikkelingsstoornissen	3
1.11 Effecten op ontwikkeling en functioneren van het zenuwstelsel.....	3
1.11.1 Multiple Chemical Sensitivity Syndrome (MCCS).....	3
1.11.2 Metalen	3
1.11.3 Pesticiden	3
1.11.4 Solventen	3
1.11.5 PCB's	3
1.12 Puberteit.....	3
1.13 Endometriose	3
1.14 Schildklierandoeningen	3
1.15 Cardiovasculaire aandoeningen.....	3
2 Kwantitatieve aspecten: In welke mate bedreigt luchtpollutie de gezondheid? ...	3
2.1 Inleiding en kritische beschouwingen	3
2.1.1 Berekening van gezondheidseffecten.	3
2.1.2 Epidemiologische studies.....	3
2.2 Cijfergegevens in verband met gezondheidsschade	3
2.3 De stedelijke omgeving	3
2.4 Associatie van luchtpollutie met kankerrisico	3
2.5 Effecten van luchtpollutie op de longen.....	3
2.6 Respiratoire pathologie	3
2.7 Maatregelen tegen luchtpollutie werken remediërend.....	3

2.8	Inductie van astma	3
2.9	Inductie van allergieën.	3
2.10	Effect op geboortegewicht.....	3
2.11	Verhoogde sterfte van pasgeborenen.	3
2.12	Verminderde groei bij pre-adolescente kinderen.....	3
2.13	Lood in het bloed van kinderen.	3
2.14	Verhoogde concentraties van luchtpartikels in relatie tot sterfte.	3
2.15	Verminderde levensverwachting.	3
2.16	Verhoogde incidentie van diabetes.	3
2.17	Optreden van immunodepressie.	3
2.18	Sterfte door cardiovasculaire aandoeningen.....	3
HOOFDSTUK 2		3
BEMONSTERING VOOR EFFECTGERICHTE METINGEN.....		3
1	Inleiding	3
2	Staalname artefacten	3
3	Bemonstering	3
3.1	Basisprincipes	3
3.2	Staalname methodes	3
3.2.1	Dynamische methodes.....	3
3.2.2	Passieve methodes.....	3
3.2.3	Afstrippen.....	3
3.3	Bemonstering in functie van rechtstreekse blootstelling in testsysteem.	3
3.3.1	Dynamische methodes.....	3
3.3.2	Passieve methodes.....	3
4	Extractie procedures.....	3
4.1	Organische extractie	3
4.1.1	Inleiding.....	3
4.1.2	Soxhlet extractie (EPA method 3540C).....	3
4.1.3	Automatische Soxhlet extractie (EPA Method 3541).....	3
4.1.4	Accelerated Solvent Extraction (EPA Method 3545).....	3
4.1.5	Ultrasonic extraction (EPA method 3550B).....	3
4.1.6	Microwave extraction (EPA method 3546).....	3
4.2	Supercritical fluid Extraction (EPA method 356X)	3
5	Internationale standaardmethodes	3
HOOFDSTUK 3		3
OVERZICHT VAN TESTS		3
1	Inleiding	3
2	Systemische toxiciteit	3
2.1	Acute toxiciteit	3
2.1.1	Cytotoxiciteitstest voor membraanschade.....	3
2.1.2	MTT assay	3
2.1.3	De Alamar Blue test	3
2.1.4	De neutraal rood cytotoxiciteitstest	3
2.2	Chronische toxiciteit	3
2.3	Nefrotoxiciteit	3
2.4	Neurotoxiciteit	3
2.5	Cardiovasculaire toxiciteit.....	3
2.6	Oxidatieve stress en vorming van reactieve zuurstofdeeltjes (ROS).....	3

2.7	Hepatotoxiciteit.....	3
3	Genotoxiciteit.....	3
3.1	Algemeen	3
3.1.1	Biologische betekenis van mutaties.	3
3.1.2	Belang van mutaties in het ontstaan van kanker.....	3
3.1.3	Enkele eigenschappen van genotoxische carcinogenen.....	3
3.1.4	Strategie voor detectie van genotoxische activiteit: enkele noties.....	3
3.2	Kandidaattests voor screenen van genotoxiciteit	3
3.2.1	Tests voor genotoxische schade.....	3
3.2.2	Tests voor genmutaties (puntmutaties, kleine deleties en inserties)	3
3.2.3	Tests voor chromosoommutaties bij zoogdier- of humane cellen.....	3
3.2.4	Tests voor genoommutaties bij zoogdier- of humane cellen	3
3.2.5	Tests voor transformatie en inductie van het tumorale fenotype	3
4	Hematotoxiciteit.....	3
4.1	Het bloedvormend systeem als targetorgaan.....	3
4.2	Opbouw van het immuun- en bloedvormend systeem	3
4.3	<i>In vitro</i> tests.....	3
5	Immuno-respiratoire toxiciteit	3
5.1	Immunotoxiciteit	3
5.2	Immuno-Respiratoire toxiciteit.....	3
5.2.1	Anatomie van de luchtwegen: Mechanische afweer	3
5.2.2	Fagocytose en niet-specifieke ontsteking	3
5.2.3	Specifieke immuunrespons:	3
5.3	Kandidaattests voor screenen van immuno-respiratoire toxiciteit	3
5.3.1	<i>In vitro</i> tests opgenomen in ECVAM, INVITTOX database	3
5.3.2	Andere <i>in vitro</i> tests	3
6	Reproductietoxiciteit	3
6.1	Algemeen	3
6.2	Eindpunten en kandidaattests voor screening van reproductietoxiciteit	3
6.2.1	Fertiliteit	3
6.2.2	Implantatie.....	3
6.2.3	Embryotoxiciteit.....	3
7	Endocriene toxiciteit	3
7.1	Algemeen	3
7.2	Eindpunten en kandidaattests voor screening van hormonale verstoring	3
7.2.1	Tests voor oestrogeen actieve stoffen	3
7.2.2	Tests voor androgeen actieve stoffen	3
7.2.3	Tests voor aromatase activiteit.....	3
7.2.4	Tests voor schildklier activiteit.....	3
	HOOFDSTUK 4	3
	EVALUATIE VAN DE BRUIKBAARHEID EN RELEVANTIE VAN TOXICOLOGISCHE METHODEN IN DE VLAAMSE CONTEXT.....	3
1	Context en Verantwoording	3
2	Methodologie.....	3
2.1	Kosten van uitvoering (KU)	3
2.2	Snelheid van uitvoering (SU).....	3
2.3	Responspectrum en sensitiviteit (RS).....	3
2.4	Standaardprocedure en ringstudies (SR).....	3
2.5	Beschikbaarheid van testsysteem/testorganismen (BT).....	3

2.6	Relevantie (RE).....	3
2.7	Toepassing voor lucht (TL).....	3
2.8	Internationale erkenning (IE).....	3
3	Resultaten van evaluatie tests volgens criteria.....	3
3.1	Evaluatiefiches voor tests.....	3
3.2	Evaluatie van tests voor cytotoxiciteit en systemische toxiciteit	3
3.3	Evaluatie van tests voor kankerverwekkend vermogen of genotoxiciteit.....	3
3.3.1	Tests voor scenario 1.....	3
3.3.2	Tests voor scenario 2.....	3
3.3.3	Tests voor scenario 3.....	3
3.4	Evaluatie van tests voor immuun-respiratoire toxiciteit.....	3
3.5	Evaluatie van tests voor reproductie en endocriene toxiciteit.....	3
4	Selectie van methodeS voor bemonstering en staalvoorbereiding.....	3
4.1	Inleiding.....	3
4.2	Bemonstering	3
4.3	Staalvoorbereiding	3
4.4	Voorstel van methode	3
	HOOFDSTUK 5.....	3
	VOORSTEL VAN TESTPROTOCOL VOOR UITVOERING PILOOTPROJECT “EFFECTGERICHT METEN VAN LUCHT”	3
1	Inleiding.....	3
2	Opzet van een pilootproject.....	3
2.1	Doel.....	3
2.2	Aanpak.....	3
	HOOFDSTUK 6	3
	REFERENTIES	3
	HOOFDSTUK 7	3
	BIJLAGEN	3
1	Bijlage: systemische en cytotoxiciteit.....	3
1.1	Fiches voor geselecteerde tests systemische en cytotoxiciteit (CS)	3
2	Bijlage : Immuno-respiratoire toxiciteit.....	3
2.1	Overzicht protocols voor standaardtests	3
2.1.1	Huidirritatie.....	3
2.1.2	Oogirritatie.....	3
2.1.3	Huidsensitisatie	3
2.2	Vergelijkende tabel met testinformatie voor fiches immuno-respiratoire toxiciteit	3
2.3	Fiches voor geselecteerde tests immuno-respiratoire toxiciteit (IR)	3
3	Bijlage : reproductie en endocriene toxiciteit	3
3.1	Vergelijkende tabel met testinformatie voor fiches	3
3.2	Fiches voor geselecteerde tests endocriene toxiciteit (ER).....	3

SAMENVATTING

Het voorliggend rapport is het resultaat van een onderzoeksopdracht “*Evaluatie van de luchtkwaliteit in Vlaanderen door effectgerichte metingen in de omgevingslucht*” uitgevoerd via een samenwerking tussen Vito, Milieutoxicologie en Universiteit Gent.

Op basis van literatuurstudie en ervaring bij de betrokken onderzoekspartners werden de mogelijkheden van effectgerichte tests, die de potentiële impact van diverse polluenten op de gezondheid op een geïntegreerde wijze meten, in kaart gebracht.

De hoge incidentie van een aantal “beschavingsziekten” zijn mogelijk voor een deel te wijten aan diverse agentia en milieupolluenten die zich via de lucht verspreiden. In een eerste hoofdstuk werd een inventarisatie gemaakt van meerdere ziekten of gezondheidsproblemen: kanker, geboorteafwijkingen, fertiliteitsproblemen, allergieën, auto-immuunziekten, astma, chronische obstructieve longaandoeningen, cardiovasculaire aandoeningen en sommige neurodegeneratieve aandoeningen. Met behulp van literatuurgegevens werd een mogelijke relatie tussen het voorkomen en de blootstelling aan dergelijke agentia (stofdeeltjes, zware metalen, vluchtige verbindingen, organische micropolluenten,...) en hun mogelijke rol bij de inductie van bepaalde ziektebeelden beschreven.

Om blootstelling aan polluenten via de lucht te meten zijn er bemonsteringstechnieken vereist die een representatief en reproduceerbaar staal opleveren van wat er in de lucht voorkomt. Diverse methoden werden besproken in hoofdstuk 2. Ook werd aangetoond dat methoden voor staalbehandeling zeer belangrijk zijn in relatie tot biocompatibiliteit voor het meten in effectgerichte tests.

Dergelijke effectgerichte tests steunen meestal op bepaalde biochemische en fysiologische functies in organismen. Een verstoring van deze functies ligt veelal aan de basis van beschreven ziektebeelden. Voor het opzetten van een kosten-efficiënt meetnet voor screeningsdoeleinden genieten ‘*in vitro*’ test de voorkeur. Dit zijn tests waarbij hetzij in lagere organismen (bacteriën, gisten) of in geïsoleerde systemen (zoogdiercellen) bepaalde werkingsmechanismen van toxische stoffen bestudeerd kunnen worden. Op basis van verzamelde gegevens omtrent gezondheidsproblemen (hoofdstuk 1) werden een aantal relevante eindpunten voor potentieel toxicologische effecten weerhouden. Met name voor systemische toxiciteit, genotoxiciteit en kankerverwekkend vermogen, immuun- en respiratoire toxiciteit, hormoon- en reproductietoxiciteit werd een stand van zaken gemaakt van bestaande tests in hoofdstuk 3.

Voor een selectie van toepasbare tests in een effectgericht meetnet zijn diverse criteria als responspectrum, standaardisatie, gevoeligheid,... belangrijk. Meerdere tests werden daarom volgens een in hoofdstuk 4 gedefinieerde methodologie geëvalueerd en voor elk van de eindpunten werden één tot meerdere tests weerhouden voor eventuele implementatie in een effectgericht meetnet voor lucht.

De informatie met betrekking tot bemonsteringsmethoden van lucht en een selectie van screeningstests gebaseerd op toxische werkingsmechanismen, liet toe een voorstel te formuleren voor een pilootproject.

HOOFDSTUK 1

LUCHTVERONTREINIGING ALS PATHOGEEN AGENS.

Prof. Dr. N. Van Larebeke
mede op basis van documenten overgemaakt door
prof. Dr. G. Schoeters

1 PATHOLOGIËN MET VERHOOGDE INCIDENTIE OF ERNST DOOR LUCHTPOLLUTIE.

Luchtpollutie wordt naast andere causale milieufactoren, als één van de meest belangrijke doodsoorzaken beschouwd. Dit wordt geïllustreerd in onderstaande tabel, overgenomen uit de studie van De Hollander et al. (1999).

Tabel 1: Relatief belang van verschillende milieufactoren met uitzondering van verkeer en huiselijke ongelukken op het verlies aan gezondheid (uitgedrukt in DALYs) Uit De Hollander et al. (1999).

	DALYs
Zwevende stof partikels (lucht)	59%
Lange termijn effect	
Lawaai	24%
Lood	6%
Voeding gerelateerd	3,3%
Tabaksrook in milieu (ETS)	3,2%
Zwevend stof (korte termijn effecten)	2,3%
Radon (binnenhuis)	1,37%
Vocht (binnenhuis)	1,3%
Ozon	1,12%
UVA-UVB	0,41%
PAH	0,19%
Benzeen	0,1%
Grote milieuaccidenten	0,02%
Luchtverontreiniging met carcinogenen	0,01%

Bij deze berekeningen werd rekening gehouden met de ernst van het effect op verlies van levenskwaliteit (DALYs) en met de specifieke blootstelling in Nederland.

In hiernavolgend deel wordt een inventarisatie gegeven van de verschillende ziektebeelden, die op één of andere manier te maken kunnen hebben met problemen van luchtpollutie. Gezien deze studie ook aandacht dient te besteden aan endocriene verstoring zijn ook gegevens omtrent de gezondheidseffecten van endocrien verstorende stoffen opgenomen (uit een nota opgesteld door A. Mahmoud en medewerkers, 2004 en uit een nota opgesteld door N. van Larebeke voor de Vlaamse Gezondheidsraad), hoewel het niet zeker is, en in sommige gevallen zelfs onwaarschijnlijk, dat luchtpolluenten echt van belang zijn voor alle betreffende pathologieën.

1.1 Verstoring van de weefselstructuur van de long en van de longfunctie

Door directe toxische inwerking, door inductie van inflammatie en door immuunverstorende en allergiebevorderende activiteit kunnen tal van luchtpolluenten de weefselstructuur van de long en de longfunctie ongunstig beïnvloeden. Zie hiervoor het 2^{de} deel van dit hoofdstuk over kwantitatieve aspecten.

Stikstofdioxide (NO₂) en ozon veroorzaken inflammatie; zwaveldioxide veroorzaakt bronchoconstrictie; deze agentia verergeren de bronchiale overprikkelbaarheid van astmatici. De laatste tijd wordt het meest belang gehecht aan de *kleinste partikels*, deze met een aërodynamische diameter kleiner dan 10 µm, de zgn PM10 en nog meer de fijne PM2,5 en ook de ultrafijne (diameter < 0.05 - 0.10µm). Ze worden vooral in verband gebracht met het toenemend wegverkeer en de uitlaatgassen van dieselmotoren. De fijnste partikels zouden ook binnen de huizen doordringen, wat hun schadelijke rol kan versterken. De voornaamste bekende effecten van de PM10 zijn dat toenemende concentraties geassocieerd zijn met hogere cardiovasculaire en respiratoire mortaliteit, vooral bij ouderlingen; bij kinderen meer met astma-aanvallen en longfunctieafnames. De fijne partikels dringen diep door in de luchtwegen. Ze blijken ook doorheen de alveolo-capillaire membraan te dringen wat de cardio-vasculaire effecten verklaart, o.m. via stornissen in de bloedstolling. Recent onderzoek, uitgevoerd bij vrijwilligers, heeft aangetoond dat dieseluitletgasen, vermoedelijk via deze partikels een belangrijk inflammatoir effect hebben t.h.v. luchtwegen, waarbij verschillende types van cellen betrokken zijn. Of het de partikels zelf zijn die de effecten uitlokken of substanties op hen gebonden moet ook door meer onderzoek uitgemaakt worden. Belangwekkend is dat deze inflammatoire effecten niet geheel voorkomen werden als een 'particle trap' werd ingeschakeld, die het aantal partikels met 46 % reduceerde. Dit doet vermoeden dat de inflammatie verwekt wordt door sterk irriterende componenten in de gasfase. Gedacht wordt aan sterk irriterende organische bestanddelen zoals aldehyden.

1.2 Astma

Astma wordt gekenmerkt door een overprikkelbaarheid van de luchtwegen leidend tot een partieel of volledig omkeerbare vernauwing van de luchtwegen als gevolg van samentrekking van de gladde spieren in de wand en/of opzwellen van de slijmvliezen. Onder invloed van acuut en sterk inwerkende prikkels, vooral infectieuze agentia, kunnen acute astma-aanvallen optreden die levensbedreigend kunnen zijn. In Antwerpen bedraagt de gemiddelde prevalentie ongeveer 7 %. Bij volwassenen was de prevalentie hoger in stedelijk dan voorstedelijk milieu. Van 1991-2 naar 1996-7 was de prevalentie bij volwassenen met ongeveer 30 % gestegen. In de periode 1993-1998 werd jaarlijks voor gemiddeld 164 personen astma als doodsoorzaak aangegeven; 68 % hiervan waren 65 jaar of ouder, slechts 8 % jonger dan 45 jaar. De gemiddelde jaarlijkse directe kosten van matig tot zwaar astma worden op 99.000 BEF (€ 2454,15) geraamd, waarvan 52 % door hospitalisatie, 14 % door consultaties en 34 % door medicaties (MIRA 2000).

Het ontstaan van klinisch manifest astma zou vanaf de geboorte bij het jonge kind volgens een drietal stadia verlopen :

- *wijziging van de immuunrespons* van het individu onder invloed van 'sensitizers', zoals allergenen; er ontstaat o.m. een predominantie van Th2-lymfocyten i.p.v. de natuurlijk overheersende Th1- respons;
- *ontstaan van luchtweginflammatie*, volgens nog niet goed begrepen mechanismen, onder invloed van een aantal 'enhancers', versterkende invloeden, o.m. ozon, dieselpartikels, rhinovirussen, endotoxine (dat zich o.m. in het huisstof bevindt);

- *optreden van astmaklachten* onder invloed van 'triggers' die meer de ontstane bronchiale overprikkelaarbaarheid aantonen; dergelijke triggers zijn bv. inspanning, koude lucht, passief roken. 'Enhancers' en 'sensitizers' kunnen later ook nog als 'triggers' optreden.

Milieufactoren die kunnen bijdragen tot het ontstaan van astma zijn: *allergenen*, in onze streken vooral de huisstofmijt; *bestanddelen uit de sigarettenrook* : passief roken lijkt wel een belangrijke omgevingsfactor te zijn, vooral tijdens de eerste twee levensjaren van het kind maar wellicht ook tijdens de zwangerschap; *andere componenten van verontreiniging van de binnenlucht* : bv. stikstofoxides, formaldehyde, isocyanaten, die rechtstreeks op de luchtwegen kunnen inwerken of de gevoeligheid voor allergenen kunnen bevorderen; *componenten van verontreiniging van de buitenlucht*, waaronder de fijne dieselpartikels die een belangrijke rol zouden kunnen spelen.

1.3 COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease)

Verantwoordelijk voor de chronische luchtwegobstructie zijn afwijkingen in de kleine luchtwegen en/of in het longparenchym. De parenchymcomponente wordt **emfyseem** genoemd en berust op overinflatie en destructie van het longparenchym. Voor de kleine luchtwegencomponente werd de naam **chronische obstructieve bronchiolitis** voorgesteld. Al of niet gecombineerd met de chronische luchtwegobstructie kan er chronische mucushypersecretie zijn met chronisch hoesten en overvloedig opgeven van sputum; dit noemt men **chronische bronchitis**. Ook personen met COPD zijn onderhevig aan **acute exacerbaties**. Bij een pilootonderzoek in Antwerpen bedroeg de prevalentie van een gestoorde longfunctie 14 % in de leeftijdsgroep van 45 tot 75 jaar. COPD, die vooral door roken wordt veroorzaakt komt zelden voor vóór de leeftijd van 45 jaar, meestal vanaf de leeftijd van 65 jaar. Mannen worden 4 à 6 maal meer aangetast dan vrouwen. De prevalentie is hoger in stedelijke agglomeraties en in de minder begoede sociale klassen. In Vlaanderen sterven jaarlijks ongeveer 2500 personen door COPD. In 1996 bedraagt de gemiddelde jaarlijkse kost voor een gevorderde COPD-patiënt 166.000 BEF (€ 4115), waarvan 8 % voor consultaties, 34 % voor medicatie en 60 % voor hospitalisaties. In België is COPD verantwoordelijk voor 10% van de acute hospitalisaties, 20% van het arbeidsverzuim en 12% van definitieve invaliditeit (MIRA 2000).

Het *roken van sigaretten* is veruit de belangrijkste omgevingsfactor in het ontstaan van COPD door de aanwezigheid in de rook van hoge concentraties oxidantia en andere toxische bestanddelen. Plantaardige textielvezels (katoen, linnen), graanstof en sommige soorten van anorganisch stof (steenkool, kwarts, silicium) kunnen ook een rol spelen. Cadmium lijkt vrij zeker betrokken bij het ontstaan van emfyseem. Cadmium wordt hoofdzakelijk via de voeding ingenomen, maar in mindere mate ook via de ademhaling (Ikeda et al., 2000). Over de rol van atmosferische luchtvervuiling bij het ontstaan van COPD bestaat nog twijfel; men vermoedt sterk een rol voor hoge gehalten van SO₂ en zwevende stofpartikels (MIRA 2000).

1.4 Interstitiële longaandoeningen

Dit zijn een grote heterogene groep van aandoeningen gekenmerkt door een aantasting van de alveolo-capillaire eenheden, dus het fijne longweefsel. Ze kunnen vooral evolueren naar onherstelbare longfibrose en respiratoir falen.

Exogene factoren die interstitiële longaandoeningen kunnen veroorzaken:

- *organische bestanddelen* die **extrinsieke allergische alveolitis** (ook overgevoeligheids-pneumonitis genoemd) kunnen veroorzaken. De lijst van mogelijke agentia is lang; meest frequent in België is de vogelkwekerslong (o.m. bij duivenmelkers); andere worden veroorzaakt door schimmels, eiwitten van andere dieren, bacteriën, chemicaliën (o.m.

isocyanaten)

- anorganisch stof met als gevolg **pneumoconiosen**. Best bekende zijn de silicose en de asbestose, waarvan nu nog weinig nieuwe gevallen gezien worden. Nieuwere worden door metalen veroorzaakt. In België werden een tiental jaren geleden veel gevallen van cobalt-pneumoconiose geobserveerd bij diamantslijpers. Recent werd melding gemaakt van pneumoconiosen door glaswol en 'nylon flock' (MIRA 2000).

1.5 Atopie en allergie

1.5.1 Prevalentie

De hoge en stijgend geachte prevalentie van allergie draagt ongetwijfeld bij tot de interesse in de relatie milieu-gezondheid. Prevalentiecijfers voor astma lopen uiteen van 2 % voor de Scandinavische landen tot 10 % voor Australië. Onderstaande tabel 2 geeft de prevalentiecijfers weer uit een studie (Janssens 1999) in de Antwerpse regio.

Tabel 2: Prevalentie van vaak voorkomende aandoeningen die met allergie geassocieerd zijn in een schoolpopulatie van 1089 leerlingen tussen 6 en 18 jaar

Klacht	Cumulatieve prevalentie (%)	Prevalentie (%)
astma	4.0	2.0
hooikoorts	9.8	5.7
frequente verkoudheden	10.2	3.3
frequente bronchitis	6.9	2.5
valse kroep	4.4	0.6
chronische neusklachten	8.1	4.8
alle ademhalingsklachten	27.6	13.7
atopisch eczeem	7.6	4.0
alle klachten	31.9	16.6

Voor de toename van de prevalenties worden multipale oorzaken aangehaald, o.a. luchtbezoedeling, westerse levenswijze en een verminderd aantal infecties. Maar binnenhuispollutie zou een belangrijke rol kunnen spelen: de snelheid waarmee de binnenhuislucht wordt verwisseld is 10 maal trager nu dan 30 jaar geleden (Von Mutius, 2000).

1.5.2 Ontstaansmechanismen van allergische reacties.

1.5.2.1 Types van schadelijke immunologische reacties.

Allergisch-stimulatie	Ortho-ergisch-suppressie	Auto-immuun
Abnormale reactie van het organisme t.o.v. vreemde antigenen	Normale reactie van het organisme t.o.v. vreemde antigenen bv. Transplantatierejectie graft versus host reactie	Abnormale reactie van het organisme t.o.v. lichaamseigen antigenen

1.5.2.2 Allergische reacties

Allergische reacties kunnen als volgt worden ingedeeld:

B-Cel activiteit Humoraal Onmiddellijk / semi-laattijdig	T-Cel activiteit Cellulair Laattijdig
Type I: Anafylaxie: IgE gemedieerd - lokaal - algemeen type II: Cytotofiele antilichamen type III: Oplosbare immuuncomplexen - antilichaam overmaat - antigeen overmaat	type IV: vertraagde overgevoeligheid

1.5.2.3 IGE gemedieerde reacties

De meest frequent voorkomende allergische reacties ontstaan door het feit dat tegen "onschuldige" stoffen (antigenen zoals pollen, huisstofmijt), IgE antistoffen worden gemaakt. Bepaalde individuen hebben een erfelijke aanleg om gemakkelijk IgE antistoffen te maken tegen antigenen waartegen andere individuen geen antistoffen of IgG antistoffen zouden maken. Deze erfelijke eigenschap noemt men **atopie**. Atopische individuen hebben frequenter aandoeningen als astma, rhinitis, conjunctivitis en atopisch eczeem. De antigenen van de allergische reactie worden ook allergenen genoemd. Deze IgE antistoffen kunnen zich binden met **mastcellen** in huid en slijmvliezen, en **basofielen**, een soort witte bloedcellen. Wanneer het organisme opnieuw in contact komt met de antigenen waartegen IgE antistoffen zijn gevormd zullen deze antigenen binden op IgE moleculen op de mastcel en/of basofiel, en zullen zij in deze cellen een biochemische reactie op gang brengen die leidt tot de vrijzetting van chemische stoffen, mediators genaamd, die zelf zullen inwerken op de omliggende cellen en weefsels.

1.5.2.4 IgG gemedieerde reacties

Bij sommige allergische reacties worden op de vreemde stoffen geen IgE antistoffen gevormd doch eerder IgG antilichamen. De uitlokkende factoren zijn hier meestal organische bestanddelen (schimmels, afbraakproducten van planten, duivenmest...). Wanneer het individu dat deze antistoffen heeft aangemaakt opnieuw in contact komt met de uitlokkende antigenen, dan zullen zich op de plaats waar deze antigenen in het organisme komen (meestal in de longen door inhalatie) immuuncomplexen vormen tussen de geïnhaleerde antigenen en de gevormde IgG antistoffen. De IgG antistoffen, die met antigenen gebonden zijn, kunnen een reeks van eiwitten activeren (het complement), wat aanleiding zal geven tot ontsteking. In de pathogenese van deze reacties spelen de cellen, die verantwoordelijk zijn voor het ontstaan van de immuunreacties, de lymfocyten, ook een belangrijke rol. Deze reacties spelen zich meest af in de long en worden als allergische alveolitis omschreven. Voorbeelden van allergische alveolitis zijn air conditioning ziekte, luchtbevochtigersziekte, duivenmelkersziekte, vogelkwekersziekte, boerenlong,

1.5.2.5 Invloed van het micromilieu

Hieronder verstaan we specifieke omgevingsfactoren die onmiddellijk gerelateerd zijn met de persoon en die minder of niet beïnvloed worden door algemene factoren die verband houden

met de leefomgeving. Het gaat hier om de omgevingsfactoren aanwezig in het huiselijk milieu, de school, het beroep en de hobby'sfeer.

1.5.2.5.1 De huiselijke sfeer

Hier spelen onder andere de huisstofmijt, dierlijke antigenen, schimmels, tabaksrook en schoonmaakproducten een rol.

1.5.2.5.2 De beroepsfeer

Een belangrijke toename van overgevoeligheid werd in het laatste decennium vastgesteld voor natuurlijke rubber latex in de medische en paramedische sector doch ook in de algemeen populatie.

Een bijzondere situatie wordt aangetroffen in gebouwen in de werksfeer: enerzijds erkent men daar het zogenaamde "**sick building syndrome**", waarvan de juiste oorzaak niet gekend is en anderzijds een allergische aandoening, de **air conditioning of bevochtigersziekte**.

1.5.2.6 Invloeden uit het macromilieu

Met het macromilieu bedoelen we die omgevingsfactoren die een individu weinig of niet zelf in de hand heeft.

1.5.2.6.1 Inhalatieallergenen

In de populatie neemt de frequentie van allergie aan de inhalatieallergenen toe. Vaak wordt hiervoor een oorzaak gezocht in het milieu. Een onderzoek toonde aan dat in 1991-1995, in vergelijking met 1975-1979, de frequentie van overgevoeligheid voor huisstofmijt, grassen en onkruiden quasi onveranderd was maar dat de overgevoeligheid aan boompollen was toegenomen van 11 naar 37 percent (MIRA 2000). Een toename van de boompollenovergevoeligheid is geassocieerd aan overgevoeligheid aan fruit en groenten bij ongeveer 33 % van de overgevoeligen en zal dus gepaard gaan met een toename van de voedselovergevoeligheid.

1.5.2.6.2 Chemische irritantia

Chemische irritantia zoals ozon, stikstofoxiden en zwaveldioxide kunnen astma uitlokken bij astmatici: de open vraag is: kunnen deze bestanddelen zelf astma veroorzaken? Recente gegevens wijzen eerder in de richting van een verergering van bestaand astma door luchtpollutie dan een oorzakelijk verband (Koenig, 1999).

1.5.2.6.3 Partikels

Dieseluitlaatgassen zouden een rol spelen in het ontwikkelen van allergie. Deze koolstofpartikels, beladen met een aantal organische stoffen zijn in staat om zich te binden met een aantal allergenen die in de lucht aanwezig zijn. De partikels kunnen bij het proefdier en de mens een verhoogde aanmaak van IgE antistoffen tegen de desbetreffende allergenen induceren. Ook latexpartikels kunnen in dit verband belangrijk zijn. Bedoeld wordt hier de latex partikel die van banden afslijten en in de lucht aanwezig zijn. Deze latexpartikels zouden niet alleen klachten kunnen veroorzaken bij individuen die latex overgevoelig zijn, maar ook voor latex sensibiliseren en adjuvantia zijn bij andere allergieën.

1.6 Auto-immuunziekten

Het immuunsysteem kan tientallen miljoenen verschillende antigenen als vreemd herkennen: in principe kan ieder wezen via zijn immuunsysteem alle mogelijke herkenbare antigenen herkennen, dus ook deze die eigen zijn aan dat wezen zelf. Bij het ontwikkelen van het immuunsysteem zullen de immuuncompetente cellen, zolang het individu in utero aanwezig is,

die lichaamseigen antigenen kunnen herkennen, vernietigen of uitschakelen (clonale selectietheorie van Burnett), zodat na de geboorte het immuunsysteem enkel nog door vreemde antigenen kan gestimuleerd worden.

Het uitschakelen van de cellen die vreemde antigenen kunnen herkennen gebeurt door een vernietiging of functionele suppressie van de regulerende T-lymfocyten, die de B-lymfocyten moeten helpen om antistoffen te maken. Dit betekent dus dat de B-lymfocyten in principe de eigenschap behouden om antistoffen te maken tegen lichaamseigen antigenen, doch dit niet doen omdat ze hiertoe niet gestimuleerd worden door de T-lymfocyten. Na de geboorte kunnen in bepaalde omstandigheden stoornissen optreden in de immuunregulatie: zo is het mogelijk dat de T-lymfocyten die een immuunantwoord tegen eigen antigenen onderdrukken (T-suppressor lymfocyten), niet meer actief zijn en zodanig auto-immuunreacties gaan toelaten: T- en B-lymfocyten die actief worden tegen lichaamseigen antigenen, meestal aanwezig in/op lichaamseigen cellen.

De mechanisme waardoor deze T-lymfocyten abnormaal gaan reageren zijn niet voldoende bekend. Een aantal mogelijkheden zijn:

- 1) vreemde antigenen lijken zo sterk op lichaamseigen antigenen dat de antistoffen ertegen ook kruisreageren (moleculaire mimicry) met de lichaamseigen antigenen
- 2) de regulerende T-lymfocyten worden door geneesmiddelen, bestraling of andere xenobiotica geïnhibeerd.

1.6.1 Soorten auto-immuunreacties

Auto-immuunreacties worden doorgaans onderverdeeld naargelang ze tot één (of meerdere) orgaan(en) gelokaliseerd blijven, dan wel meerdere orgaansystemen van ons lichaam ziek maken (systeemziekten). Voorbeelden van gelokaliseerde auto-immuunziekten zijn: auto-immuun endocrinopathieën die de schildklier (hyper- of hypofunctie), bijnier (hypofunctie), ovarium (hypofunctie) of hypofyse (hypofunctie) treffen; auto-immune gastro-intestinale afwijkingen zoals de chronische agressieve hepatitis (leverontsteking) en de primaire biliaire cirrose (ontsteking van de kleine galwegen in de lever); auto-immune huidaandoeningen zoals pemfigus, pemfigoïd (ziekte met blaarvorming en antistoffen tegen huid) en de Ziekte van Dühring Brock (jeukende vesikels in huid, antihuidantistoffen). Voorbeelden van veralgemeende auto-immuunziekten (systeemziekten) zijn: reumatoïde artritis (ontstekingsziekte hoofdzakelijk van gewrichten); systemische lupus erythematoses (gewrichtsontsteking, huiduitslag, nierlijden); sclerodermie/systeemsclerose (toename van bindweefsel in huid, longen, maag-darmstelsel); dermatomyositis/polymyositis (ontsteking van huid en spieren); Wegener granulomatose (ernstige vaatontsteking, ondermeer in longen en nieren); Sjögren syndroom (ontsteking in speekselklieren en gewrichtsontsteking). De systeemziekten zijn vaak geassocieerd met het voorkomen van auto-antistoffen zoals reumafactor en antinucleaire factor.

1.6.2 Milieufactoren bij auto-immuunziekten

1.6.2.1 Straling

Zowel UV-A als UV-B stralen zijn reeds lang bekend om huidlupus of systeemlupus (systemische lupus erythematoses of SLE) te kunnen uitlokken of verergeren.

1.6.2.2 Hormonen en geneesmiddelen

Oestrogenen en een aantal geneesmiddelen kunnen systemische lupus uitlokken. De ziekte verdwijnt normaal binnen een periode van 6 maanden na het stoppen van de uitlokkende medicatie. Een Japans L-tryptofaan preparaat, gecontamineerd met sporen van een dimeer van L-tryptofaan bleek geassocieerd aan een ziektebeeld dat geleek op sclerodermie en het eosinofilia-myalgia syndroom (EMS) werd genoemd (Blackburn, 1997).

1.6.2.3 Zware metalen

Zware metalen als goud en kwik kunnen als geneesmiddelen worden toegediend of via het beroep intoxiceren. Goud induceert een nefrotisch syndroom en huidafwijkingen, terwijl kwik ook membraanuse nefropathie induceert, naast vorming van antinucleaire antistoffen en sclerodermie-achtige afwijkingen (Bigazzi, 1999). Nikkel induceert zeer frequent contactallergieën. Genetische factoren lijken belangrijk.

Blootstelling aan silicium (koolmijn, goudmijn, ...) kan niet enkel silicose (longafwijking) induceren doch ook een sclerodermie-achtige aandoening.

1.6.2.4 Voedingsfactoren

Het Toxic Oil Syndrome. In Spanje deed zich begin mei 1981 een verhoogde incidentie van atypische pneumonieën voor, vaak geassocieerd met pleuritis, met klachten van koorts, spierpijnen, artralgieën, huiduitslag en belangrijke eosinofilie (Kaufman et al., 1995). Patiënten die de ziekteverschijnselen vertoonden hadden met industriële olie gecontamineerde olie ingenomen die in niet-gelabelde flessen werd aangeboden bij van huis tot huis verkoop. Ondanks een terugtrekken van de markt van de desbetreffende olie zijn in drie jaar toch ongeveer 20.000 personen door de ziekte aangetast en zijn er 351 doden geweest.

1.6.2.5 Inhalatiefactoren / Contactfactoren

In het midden van de jaren 60 werd een nieuwe ziekte, **de vinylchloride ziekte**, vastgesteld bij werkers in de polymerisatie van vinylchloride: ze ontwikkelden een Raynaud fenomeen en bij radiografische opnamen van de vingers werd een osteolyse van de vingertoppen vastgesteld. Bij een aantal patiënten waren er ook sclerodermie-achtige afwijkingen aan handen en voorarmen. De ziekte kwam voor bij 3 % van de arbeiders, die betrokken waren bij het kuisen van de reactors na het polymerisatieproces.

Blootstelling aan verschillende solventen zoals toluen, benzeen, white spirit, perchloorethyleen en trichloorethyleen kan sclerodermie-achtige symptomen induceren. Ook na blootstelling aan epoxyharsen kon sclerodermie voorkomen.

1.6.2.6 Borstimplanten

Er is een belangrijke controverse rond de mogelijke associatie tussen silicone en paraffine borstimplanten en auto-immuunziekten, type sclerodermie, reumatoïde artritis en systemische lupus. Volgens sommige waarnemingen zou het organisme immunologisch reageren op silicone implanten.

1.6.2.7 Endocriene verstoring

Er zijn recent ook aanwijzingen gevonden voor een mogelijke rol van endocriene verstoring bij de inductie van autoimmuunziekten (Baccarelli, 1999; Golub et al., 2004).

1.7 Kanker

Luchtpollutie kan bijdragen tot de inductie van verschillende soorten kanker, dit niet alleen middels mutagene stoffen, maar ook middels endocrien versturende stoffen. De belangrijkste vorm van kanker geassocieerd aan luchtpollutie is zeer waarschijnlijk longkanker (Nyberg et al., 2000), maar daarnaast speelt luchtpollutie wellicht een rol in het ontstaan van tal van andere vormen van kanker. Het complexe mengsel van genotoxische carcinogenen aanwezig in gepollueerde omgevingslucht zal vermoedelijk ook andere vormen van kanker

induceren. Polycyclische aromatische koolwaterstoffen (een belangrijke component in omgevingslucht) zouden onder meer een rol kunnen spelen bij de inductie van borstkanker (Li et al., 1999; Rundle et al., 2000). Ook beroepsmatige blootstelling aan benzeen zou kunnen bijdragen tot het risico op borstkanker (Petralia et al., 1999). Genetisch bepaalde karakteristieken m.b.t. metabolisme van xenobiotica zijn geassocieerd met een verhoogd risico op borstkanker (Helzlsouer et al., 1998). Voor tabaksrook zou de verhouding tussen gevallen van longkanker en andere vormen van kanker 10.000 op 6.000 (10/6) zijn in Scandinavische landen (Dreyer et al., 1997). Er is geen reden om te veronderstellen dat die verhouding voor andere PAK-houdende vormen van pollutie substantieel verschillend zou zijn.

Luchtpollutie kan bijdragen tot de blootstelling aan endocrien versturende stoffen (Rudel et al. 2003), alhoewel blootstelling aan deze agentia wellicht in de eerste plaats doorheen de voeding plaats grijpt. Blootstelling aan endocrien versturende stoffen zou kunnen bijdragen tot het ontstaan van borstkanker, prostaatkanker, testiskanker, schildklierkanker en pancreaskanker (Birnbaum & Fenton, 2003).

Bepaalde vormen van luchtverontreiniging doen de ozonconcentratie in hogere luchtlagen afnemen, met als gevolg een stijging van de intensiteit van de ultraviolette straling. Deze doet de incidentie van huidkankers, waaronder melanoma, toenemen (Urbach, 1997).

1.8 Nierziekten

De laatste 20-30 jaar is duidelijk geworden dat de nier een risico-orgaan is m.b.t. blootstelling (leefmilieu, arbeid, medicatie) aan chemische stoffen, met eventueel nierinsufficiëntie tot gevolg. Dit heeft ook een economisch aspect, want de jaarlijkse kostprijs per dialysepatiënt schommelt rond de 3.000.000 BEF (€ 74368), en voor de 2.440 dialysepatiënten in Vlaanderen stemt dit overeen met een totaal kost van ongeveer 7,5 miljard BEF (€ 18.592.014). Hierbij werd geen rekening gehouden met de kostprijs voor behandeling van getransplanteerde (1.800 in Vlaanderen) en preterminale patiënten. Gebaseerd op gegevens van de EDTA (European Dialysis and Transplant Association) gaat men er momenteel vanuit dat 1% van het totaal aantal jaarlijkse gevallen van terminale nierinsufficiëntie herkend wordt als zijnde omgevings- en beroepsgebonden tengevolge blootstelling aan pollutanten zoals lood, cadmium, koolwaterstoffen etc Echter, zoals blijkt uit recente gegevens blijkt in +/- 22% van de incidenties van terminale nierinsufficiëntie in Vlaanderen de oorzaak van de ziekte niet gekend (11.6%) of onduidelijk (11.0%) te zijn wat ons toelaat te suggereren dat milieu- en beroepsmatig geïnduceerde nierinsufficiëntie een grotere impact heeft op de incidentie van terminale nierinsufficiëntie dan tot nog toe werd gedacht. Gedurende de laatste jaren werd eveneens een primaire of secundaire rol in de ontwikkeling van snel progressieve glomerulonefritis en Wegener granulomatose vooropgesteld voor zogenaamd 'nieuwe' substanties zoals siliciumhoudende verbindingen.

1.8.1 Ontstaansmechanismen van chemisch geïnduceerde nierinsufficiëntie.

Omwille van zijn functionele verscheidenheid en zijn relatieve kleine massa in verhouding tot de cardiale output, vertoont de nier een zeer grote gevoeligheid voor toxische substanties. Het is het belangrijkste orgaan voor de excretie en homeostase van water-oplosbare moleculen en doordat het eveneens metabool actief is, is het bovendien in staat bepaalde substanties te concentreren. Tevens is de tubulaire cel in staat scheikundige stoffen te bioconverteren en/of metabool te activeren. Belangrijk is eveneens dat binnen de algemene populatie sommige individuen gevoeliger zijn dan andere voor de nadelige effecten van scheikundige verbindingen ter hoogte van de nier hetgeen op zijn beurt een genetische voorbeschiktheid laat vermoeden.

1.8.2 Vroegtijdige merkers van nierbeschadiging.

De klassieke tests als index voor functionerende renale massa (de glomerulaire filtratiesnelheid (GFR) bepaald middels de creatinineklaring, serumcreatinine of serum β_2 -microglobuline (β_2 -M)) hebben een beperkte gevoeligheid. Aldus kan tot zelfs één derde van het totaal aantal nefronen beschadigd zijn zonder dat er een beduidende verandering in de glomerulaire filtratiesnelheid, serum kreatinineconcentratie of β_2 -M wordt waargenomen. Nieuwe vroegtijdige merkers zijn belangrijk voor de detectie van risicogroepen en voor de preventie in het algemeen. Bij glomerulaire lesies zullen naast de verhoogde excretie van laag-moleculaire eiwitten eveneens hoog-moleculaire eiwitten (bv. albumine; MW 80.000 Da) worden aangetroffen. Dergelijke lesies treden meestal op in een gevorderd stadium van nierfalen en zijn veelal irreversibel. Enzymuria en verhoogde excretie van laagmoleculaire eiwitten daarentegen kunnen reeds worden waargenomen bij lichte tubulaire beschadiging in een reversibel stadium (MIRA 2000).

Vroegtijdige merkers kunnen ingedeeld worden in 3 groepen zijnde *functionele* (v.b. laag moleculaire urinaire proteïnen zoals beta-2 microglobuline), *cytotoxische* (v.b. tubulaire enzymen en antigenen) en *biochemische* merkers (v.b. prostaglandines, glycosaminoglycanen). Voor heel wat vroegtijdige merkers is de segmentspecificiteit ter hoogte van het nefron gekend, wat een beter inzicht toelaat in de pathogene mechanismen en de effecten van bijvoorbeeld metalen en solventen

1.8.3 Nierinsufficiëntie door blootstelling aan zware metalen via de omgeving

1.8.3.1 Lood

Momenteel wordt bij zowel volwassenen als kinderen (grotere susceptibiliteit) de opname van loodbevattend stof en water als de belangrijkste bron van loodaccumulatie beschouwd.

De nadelige gevolgen van blootstelling aan lood verlopen volgens een continuüm en worden niet zozeer bepaald door strikte drempelwaarden (MIRA 2000).

In vele gevallen blijft de patiënt asymptomatisch tot wanneer een significante vermindering van de nierfunctie wordt waargenomen. Alsdusdanig is het etiologisch verband tussen verhoogde loodconcentraties in het lichaam en het ontstaan van chronische nierinsufficiëntie moeilijk aan te tonen temeer daar in vele gevallen simultane blootstelling aan andere toxines (vb. cadmium) niet kan worden uitgesloten. Chronische blootstelling aan matig verhoogde loodconcentraties kan aanleiding geven tot irreversibele veranderingen ter hoogte van de nier welke tot expressie komen onder de vorm van interstitiële nefritis, tubulaire atrofie en glomerulaire sclerose die uiteindelijk kunnen resulteren in terminale nierinsufficiëntie en dialysebehandeling. Bij de volwassen populatie die indertijd in dit gebied als kind waren opgegroeid werd 10 tot 40 jaar na blootstelling een significant verhoogde prevalentie van chronische nierinsufficiëntie waargenomen in vergelijking tot de incidentie van de ziekte in andere regio's. Resultaten uit de Cadmibel studie hebben aangetoond dat concentraties van lood in bloed zoals waargenomen bij de algemene bevolking (17 – 725 $\mu\text{g/L}$; 965 mannen, 1016 vrouwen) reeds gepaard kunnen gaan met verstoorde waarden van een aantal functionele renale parameters en dit na correctie voor leeftijd en gewicht. Dit liet de auteurs (Staessens et al., 1996) ondermeer toe te concluderen dat een 10-voudige stijging van de loodconcentratie in bloed geassocieerd kan worden met een daling van de creatinineklaring van 10 tot 13 ml/minuut. Meer dan 90-95% van het lood is opgeslagen in het bot, waar het een biologisch halfwaardetijd van ongeveer 30 jaar heeft en van waaruit het element kan uitgewisseld worden met het bloedcompartiment. Toch zou er een goede correlatie bestaan tussen interne dosis en de bloedspiegel. Bij volwassenen wordt een concentratie van 200 $\mu\text{g/l}$ aanvaardbaar geacht, bij kinderen 100 $\mu\text{g/l}$.

1.8.3.2 Cadmium

De algemene bevolking wordt voornamelijk aan cadmium blootgesteld via het dieet (vnl vis, schaaldieren en bepaalde vleessoorten) alsook via tabaksrook (Satarug & Moore, 2004). Het element wordt eveneens door planten opgenomen en sterk geaccumuleerd door schelpdieren. De gemiddelde dagelijkse opname van het element wordt geschat op 10 – 20 µg. Cadmium accumuleert in het menselijk lichaam en heeft een lange halfleeftijd (10-20 jaar) in de nier. Cadmium kan beschadiging van de proximale tubulus veroorzaken met een reabsorptief defect tot gevolg. Aan de hand van literatuurgegevens werd gesuggereerd dat tengevolge de pollutie van het leefmilieu door cadmium, de concentratie van het element in de niercortex gedurende de laatste eeuw met een factor 50 is gestegen in de Europese bevolking. De kritische concentratie van cadmium in de niercortex bedraagt 200 µg/g overeenkomstig een urinaire excretie van 10 µg per dag. De Cadmibel studie toonde aan dat een aantal markers van proximaal tubulaire dysfunctie met name, retinol bindend proteïne (RBP), N-acetylglucosaminidase (NAG) en β_2 -microglobuline (β_2 -M) gecorreleerd waren met de urinaire cadmiumexcretie alsook met de urinaire calciumconcentratie. Op basis van deze gegevens werd toen gesuggereerd dat bij $\pm 10\%$ van de Belgische bevolking de interne cadmiumdosis (i.e. urinaire cadmiumexcretie: 2-4 µg/24h) aanleiding geeft tot een substantiële renale dysfunctie. Ook werd een synergetisch effect gesuggereerd tussen de interne cadmiumdosis en de aanwezigheid van diabetes. Daarenboven bleek een, zelfs relatief lage, blootstelling aan cadmium binnen de Belgische bevolking geassocieerd te zijn met botdemineralisatie en dus verhoogde botfragiliteit met een verhoogd risico voor botfracturen tot gevolg (Mira 2000).

1.8.3.3 Kwik

Het gebruik van amalgaamvullingen geeft aanleiding tot blootstelling aan anorganisch kwik terwijl het element aanwezig in het dieet voornamelijk in zijn gemethyleerde vorm i.e. organisch kwik voorkomt. De gemiddelde hoeveelheid kwik waaraan de algemene bevolking via amalgamen wordt blootgesteld wordt geschat op 10 µg/dag. Metallisch kwik is theoretisch onschadelijk na ingestie terwijl opname van kwikmetaaldamp via de ademhalingswegen aanleiding kan geven tot bronchiale beschadiging en neurotoxiciteit. Organische kwikverbindingen en metallisch kwik accumuleren voornamelijk ter hoogte van de hersenen terwijl anorganisch kwik zich voornamelijk opstapelt t.h.v. de nier. De nefrotoxische effecten van kwik zijn afhankelijk van de chemische vorm van het element. HgCl_2 (Hg^{2+}) is geassocieerd met ernstige acute tubulaire necrose. Algemeen mag gesteld dat dosissen die te laag zijn voor het induceren van acute tubulaire necrose wel aanleiding kunnen geven tot de ontwikkeling van een membraneuze glomerulaire nefritis gekarakteriseerd door glomerulaire depositie van immuuncomplexen en het ontstaan van proteïnurie binnen de 2 maand. Bepaling van de enzymurie tengevolge blootstelling aan metallisch, methyl- of fenykwik is doorgaans een index van blootstelling en laat toe preventieve maatregelen te nemen tegen het optreden van neurologische effecten

1.8.3.4 Siliciumhoudende verbindingen

In een casus-controlestudie uitgevoerd bij 272 casussen met chronische nierinsufficiëntie gerekruteerd uit centra in Antwerpen, Luik en Turnhout en 272 leeftijd-, geslacht- en regio gematchte controles kon een duidelijk verband tussen blootstelling aan siliciumhoudende stoffen en de ontwikkeling van chronische nierinsufficiëntie worden aangetoond (MIRA 2000).

1.8.3.5 Solventen

Epidemiologische studies suggereren een verhoogde blootstelling aan solventen bij patiënten met chronische glomerulonefritis in vergelijking tot deze met andere aandoeningen. In oorsprong werd solventnefropathie geassocieerd met de ontwikkeling van anti-basaalmembraam antilichaam-gemedieerde glomerulonefritis maar ook membraneuze en

subacute proliferatieve glomerulonefritis werden gerapporteerd. Glomerulonefritis is in hoofdzaak een immuun gemedieerde aandoening en vanuit dit oogpunt is de vaststelling dat bepaalde solventen een immuunsuppressieve werking hebben van bijzonder belang. Zowel experimenteel als in epidemiologische studies kon worden aangetoond dat blootstelling aan solventen resulteert in zowel glomerulaire als tubulaire beschadiging.

1.9 Geslachtsziekten

1.9.1 Mannelijke infertiliteit

Steunend op een meta-analyse van voornamelijk Europese en Noord-Amerikaanse publicaties, hebben Carlsen et al. (1992) aangetoond dat de sperma-concentratie globaal met de helft gedaald is over een periode van 50 jaar. In een re-analyse van deze studie vonden Swan et al., (1997) dat de daling in de kwaliteit van het sperma bij Europese mannen zelfs nog meer uitgesproken zou kunnen geweest zijn. De hypothese werd geformuleerd dat de blootstelling aan hormoonverstorende stoffen tijdens het intra-uterien leven verantwoordelijk is voor het zogenaamd testiculaire dysgenesis syndroom, dat cryptorchidie, hypospadie, testikelkanker en mannelijke onvruchtbaarheid omvat (Skakkebaek, 2002). Een constante afname van de kwaliteit van de spermamorfologie werd eveneens waargenomen bij jonge gezonde Vlaamse kandidaat sperma-donoren (Van Waeleghem et al., 1996).

1.9.2 Vrouwelijke infertiliteit

Gechlororeerde koolwaterstoffen zouden een rol kunnen spelen in de inductie van infertiliteit bij vrouwen, onder meer door inductie van endometriose (Gerhard et al., 1999).

1.9.3 Erectiele dysfunctie

Blootstelling aan milieupolluenten werd beschreven als risico-factor voor dysfunctie van normale erectie bij een populatie Argentijnse mannen (OR 7.1, 95% CI 1.5-33.0 voor pesticiden en OR 12.2, 95% CI 1.2-124.8 voor oplosmiddelen) (Oliva et al., 2002).

1.9.4 Vertraging van de intra-uteriene groei en inductie van spontane abortus

Dit werd beschreven voor blootstelling aan endocrien verstorende stoffen (Munger et al., 1997; Ribas-Fito et al., 2002; Siddiqui et al., 2003). Blootstelling aan PAKs bleek geassocieerd aan vertraging van de intra-uteriene groei (zie hieronder). Bij Turkse vrouwen die accidenteel werden blootgesteld aan HCB (hexachlorobenzeen) werd een sterke relatie vastgesteld tussen de serum HCB spiegel en risico op spontane abortus (Jarrell et al., 1998).

1.9.5 Sex ratio

Recente gegevens wijzen op een afname van de proportie aan mannelijke geboorten in Europa (Martuzzi et al., 2001). Een afname in de verhouding van mannelijke op vrouwelijke geboorten werd beschreven na blootstelling aan hexachlorobenzeen in hoge dosis. (Jarrell et al., 2002). Blootstelling van mannen aan 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin (TCDD) tijdens het Seveso incident in Italië (Pesatori et al., 2003) en doorheen beroepsblootstellingen (Ryan et al., 2002), waren geassocieerd aan een lagere man/vrouw sex ratio bij de nakomelingen. Er werd geen significante associatie gevonden tussen milieuverontreiniging en de proportie van mannelijke geboorten in Italië gedurende de periode 1989-1993 (Figa-Talamanca et al., 2003). Een analyse van de sex ratio gedurende een periode van 250 jaar in Finland verleende geen steun aan de hypothese dat

environmentele oestrogenen uit landbouw of industrie een rol van betekenis gespeeld hebben in de veranderingen in de sex ratio (Vartiainen et al., 1999).

1.10 Congenitale afwijkingen en prenatale ontwikkelingsstoornissen

Een exogeen agens kan de prenatale ontwikkeling van de mens verstoren door mutaties te veroorzaken, of door de intracellulaire of intercellulaire signaaltransductie te verstoren, onder meer door verstoring van de genexpressie. Teratogene effecten zijn grotendeels beperkt tot kritische perioden in de ontwikkeling. Elk weefsel en orgaan van een embryo heeft een kritische periode tijdens dewelke zijn ontwikkeling verstoord kan worden door een teratogeen. Tijdens de eerste 2 weken na de bevruchting ontwikkelen vooral extra-embryonale structuren, zodat teratogenen in deze periode vooral aanleiding geven tot abortus. De kritische periode voor de ontwikkeling van de ledematen is tussen 24 en 36 dagen na bevruchting. De meest kritische periode voor de ontwikkeling van de hersenen is tussen 3 en 16 weken, doch ook daarna differentiëren en groeien de hersenen verder zodat er letstels kunnen ontstaan tot 2 jaar na de geboorte. Dat blootstelling aan geneesmiddelen zoveel mogelijk moet vermeden worden tijdens de zwangerschap is algemeen gekend. Het is dan ook waarschijnlijk dat blootstelling aan polluenten ook teratogene effecten kan hebben, alhoewel dit bijzonder moeilijk kan aangetoond worden.

Doorheen hun mutageen effect kunnen luchtpolluenten ongetwijfeld bijdragen tot het ontstaan van overerfbare mutaties en congenitale afwijkingen. Precieze gegevens daaromtrent zijn niet bekend. Blootstelling aan endocrien verstorende luchtpolluenten kan wellicht bijdragen tot het ontstaan van congenitale afwijkingen in het algemeen, en mogelijks cryptorchidie en hypospadie in het bijzonder. Dat luchtpollutie kan bijdragen tot congenitale afwijkingen wordt gesuggereerd door het feit dat een toename werd vastgesteld van zowel chromosomale als niet-chromosomale congenitale afwijkingen bij personen die op minder dan drie kilometer afstand van een stort voor gevaarlijk afval wonen (Dolk et al., 1998; Vrijheid et al., 2002).

1.11 Effecten op ontwikkeling en functioneren van het zenuwstelsel.

(Naar MIRA- bijdrage van M. Viaene)

Voor een beschrijving van de neurologische syndromen die kunnen veroorzaakt worden door omgevingsfactoren wordt verwezen naar het wetenschappelijk rapport van Dr. Viaene. Hier beperken we ons tot een korte bespreking van het effect van een aantal blootstellingen.

1.11.1 Multiple Chemical Sensitivity Syndrome (MCCS)

Dit is een slecht gedefinieerd syndroom waarvan men zelfs nog niet zeker is of het geklasseerd moet worden als een allergische, neurologische of psychiatrische entiteit. Bij contact met lage doses van verschillende chemische stoffen ontstaan er klachten die behoren tot verschillende orgaanstelsels: kortademigheid, benauwdheid, irritatie van de slijmvliezen met neusloop, hoofdpijn, duizeligheid, concentratielast, vermoeidheid, zweten, nausea, diarree, krampen, hartkloppingen. Deze aandoening begint soms na een overmatig contact met een chemische stof, bv. door een ongeval, waarna dezelfde symptomen optreden bij steeds lagere doses van steeds meer stoffen. Er worden geen objectieve afwijkingen gevonden (normale internistische, neurologische en radiologische onderzoeken). Deze aandoening is erg sociaal handicaperend. De prevalentie ligt hoog in bepaalde landen zoals de USA (tot 30% van de bevolking zou er ooit last hebben, vrouwen meer dan mannen). De prevalentie bij ons

ligt waarschijnlijk veel lager, mogelijk door de afwezigheid van zeer actieve milieugroeperingen waardoor de alertheidsrespons niet zo op deze omgevingsprikkels gericht is. Meest waarschijnlijk gaat het hier om een angststoornis die ontstaat naar aanleiding van een bedreigende ervaring die geassocieerd wordt met de geur van chemische stoffen, meestal pesticiden, parfumgeuren, geur van verse verf (oplosmiddelen), uitlaatgassen en sigarettenrook. Een reëel hoge blootstelling, een organisch psychosyndroom of een allergie moeten uitgesloten worden.

1.11.2 Metalen

1.11.2.1 Lood

Organisch en anorganisch Pb passeren de bloed-hersenbarrière.

Klinische effecten van anorganisch lood: Lood heeft een breed spectrum van neurotoxische effecten, waarvan de pathogenese nog steeds niet duidelijk is. De acute toxiciteit is gebaseerd op een veranderde permeabiliteit van de capillairen (door een veranderde Ca^{++} -homeostase?) waardoor er oedeem ontstaat. Wat betreft de chronische toxiciteit interfereert Pb met genexpressies, de neurotransmitter vrijzetting, en de intracellulaire en intercellulaire signaaltransmissie. De grootste effecten treden op in de hippocampus, de cerebrale cortex en het cerebellum. Acute intoxicaties mimeren verhoogde intracraniale druk en geven zeer verscheidene klachten, van nausea en hoofdpijn over agitatie tot epilepsie. Chronische intoxicaties bij kinderen, vooral prenataal en op peuter- en kleuterleeftijd, geven aanleiding tot een verlaagd IQ, vanaf 100 $\mu\text{g/l}$, gedragsstoornissen en stoornissen in de centrale en perifere zenuwgeleiding. Chronische blootstelling aan lood, vooral prenataal en op peuter- en kleuterleeftijd geven aanleiding tot een verlaagd IQ (Srianujata 1998). Eén case-control studie toonde aan dat cerebrale palsy babies hogere bloedloodconcentraties hebben in vergelijking met normale kinderen. Het typische effect van een chronische loodintoxicatie bij volwassenen is een sensorimotorische gemengd demyeliniserende en axonale perifere polyneuropathie (met verstoring van gevoels-, autonome en motorische zenuwgeleiding) die vaak meer uitgesproken is in de bovenste ledematen dan in de onderste. Alhoewel klinische tekens meestal pas optreden met bloedloodconcentraties van 50 $\mu\text{g}/100$ ml of hoger, werden er reeds subklinische afwijkingen beschreven vanaf 30 $\mu\text{g}/100$ ml. Subklinische neuropathieën kunnen aanleiding geven tot een verhoogde incidentie van mononeuropathieën op drukgevoelige plaatsen (bv. thv. pols, elleboog, knie). Bij volwassenen doen de klachten (vermoeidheid, depressie, irritatie, psychomotorische snelheid en geheugen) en de partieel irreversibele effecten op neuropsychologische functies zich voor aan hogere bloedloodwaarden ($>500\mu\text{g/l}$) in vergelijking met kinderen. Loodblootstelling wordt ook genoemd als etiologische factor in de toename van motor neuron disease (MND, progressieve verlamming) in de geïndustrialiseerde landen. Voor deze aandoeningen is er een progressieve incidentietoename in geïndustrialiseerde streken of landen. De leeftijdsspecifieke mortaliteitsratio's van amyotrofe lateraalsklerose (een soort MND met verlamming) in België tonen aan dat in de leeftijdscategorie van 50 jaar en ouder er een progressieve verdubbeling is van de sterfte op zestien jaar tijd (IHE 1971-1987). De laatste data van het IHE duiden eerder weer op een daling, wat samenvalt met belangrijke inspanningen om de emissies van Pb (en andere neurotoxines) in het milieu te beperken. De toename van deze ziekte in de jaren '60-'80 wordt epidemiologisch vaak in verband gebracht met milieublootstelling of beroepsmatige blootstelling aan metalen (kwik, Pb, aluminium en mangaan). De nieuwste inzichten tonen aan dat een verhoogde vorming van vrije radicalen aan de basis ligt van deze ziekte. Zware metalen bevorderen de vorming van vrije radicalen.

Klinische effecten van organisch lood: omwille van de lipofiele eigenschappen van tetra-ethyl- en tetramethyllood is er een accumulatie van deze stoffen in het CZS; acute intoxicaties geven aanleiding tot een acute encefalopathie met zeer verscheidenen klachten van anorexie over hallucinaties tot epilepsie. Deze encefalopathie zou al kunnen ontstaan bij lage bloedloodconcentraties ($> 440 \mu\text{g/l}$). Chronische blootstelling geeft dezelfde

symptomen, doch het begin is sluipend. Er kan een blijvende dementie of organisch psychosyndroom optreden. Pathologische effecten op attentie-, geheugen- en psychomotorische functies werden reeds beschreven bij langdurige blootstellingen aan lage gemiddelde bloedloodconcentraties (261 µg/l).

1.11.2.2 Cadmium

Blootstelling aan Cd-dampen of Cd-partikels in de lucht zijn de belangrijkste bronnen van beroepsblootstelling, terwijl sigarettenuitrook en voeding, gecontamineerd water en grond de belangrijkste milieublootstellingen zijn.

Effecten op het centraal zenuwstelsel: verminderde attentie en psychomotorische snelheid en verminderd geheugen (Viaene et al., 2000, Hart et al., 1989). Er zijn verschillende experimentele studies bij dieren die een duidelijk effect aantonen van Cd op het ontwikkelend zenuwstelsel (Murphy, 1997). Enkele studies tijdens de zwangerschap en neonataal bij ratten tonen gedragsveranderingen (hyperactiviteit, verhoogde locomotorische activiteit,...) (Ali et al., 1990; Ali et al., 1993) en verminderd visueel-discriminatief leren. Bij repetitieve dosis zou het kunnen dat Cd centraal accumuleert door aantasting van de bloed-hersenbarrière (Murphy, 1997). Uit epidemiologisch onderzoek bij kinderen bleek dat de globale intelligentie en vooral de verbale, psychomotorische, geheugen en perceptuele vaardigheden afnemen in relatie tot Cd-concentraties gemeten in amnionvocht en haren. Bij adolescenten werd er een dosisgebonden toename van antisociaal gedrag gerapporteerd (Tabel 1 van het achtergrondrapport door Prof. M. Viaene, MIRA 2000). Bijkomende gegevens zijn dat er Parkinsonisme gerapporteerd werd bij (accidenteel en beroepsmatig) hoog blootgestelde personen (Viaene et al., 2000; Okuda et al., 1997), en dat er een clustering van nieuwe multiple sclerose gevallen in verband gebracht werd met een cadmiumpollutie van het water en het graan (Ingalls, 1989).

Effecten op het perifeer zenuwstelsel: bijna de helft van langdurig aan Cd blootgestelde werknemers bleken een aantasting van perifere zenuwen te vertonen, ook zonder dat dit te wijten kon zijn aan nierdysfunctie of loodblootstelling (Viaene et al., 1999; Musiol et al., 1981); soortgelijke afwijkingen werden bij ratten gevonden na toediening van lage concentraties Cd in het drinkwater gedurende 31 maanden (Sato et al., 1978).

1.11.2.3 Kwik

Kwik heeft in het verleden enkele van de zwaarste milieu-intoxicaties veroorzaakt doordat het in de voedselketen was terechtgekomen via lozingen in het afvalwater of via behandeling van zaden met pesticiden (methylkwik). Kwikverbindingen accumuleren in planten en vis en worden uitgescheiden in de moedermelk. Amalgaam, gebruikt voor tandvullingen, is een bijkomende blootstellingsbron. Afhankelijk van de chemische vorm (elementair metaal of organische verbinding) veroorzaakt het een toxische encefalopathie met irritatie of andere gedragsstoornissen, psychose, ataxie, dysarthrie, constrictie van de visuele velden, doofheid, Parkinsonisme, aantasting van perifere zenuwen of een MND met progressieve verlamming. Bij prenatale blootstelling geeft het zware hersenbeschadigingen. Voor organische kwikverbindingen kan er een latentieperiode bestaan van weken tot maanden voordat de symptomen uitbreken. De effecten van chronische lage milieublootstelling zijn meestal niet te scheiden van andere blootstellingen aan zware metalen (Pb, Cd,...) en zijn nog onduidelijk (Chang, 1995; Feldman, 1999).

1.11.2.4 Thalium

Acute intoxicaties of cumulatieve doses door beroepsmatige blootstelling, accidentele ingestie of suicide zijn goed gekend en geven typisch een pijnlijke aantasting van de perifere zenuwen samen met tremor, bewegingsstoornissen, gastro-intestinale last, epilepsie, myoclonieën, depressie, gedragsstoornissen en aantasting van het autonome zenuwstelsel. Er is slechts één onderzoek verricht naar chronische toxiciteit door milieublootstelling

(omgeving van een cementfabriek met thaliumcontaminatie van de lucht). Dit toonde net zoals bij de acute een beeld van een lichte toxische encefalopathie en een aantasting van de perifere zenuwen (Feldman, 1999).

1.11.2.5 Aluminium.

Aluminium stapelt zich op in de zenuwcellen van alzheimer patiënten. Ook werd er een verhoogde prevalentie van alzheimer beschreven in regio's waar er veel aluminium in het drinkwater aanwezig was. Maar uitgebreide meta-analyses hebben nooit een duidelijk verband kunnen aantonen tussen toxische stoffen in het leefmilieu en alzheimer. Wellicht versnellen hoge aluminiumconcentraties enkel het ziekteproces (achtergrondrapport door Prof. M. Viaene, MIRA 2000). Bij intense blootstelling aan aluminium zijn toxische encefalopathieën (depressies, incoördinatie, geheugenstoornissen) en epilepsie-aanvallen beschreven (Feldman, 1999).

1.11.3 Pesticiden

Parkinsonisme zou mede door omgevingsfactoren veroorzaakt worden. Een vergelijking van de prevalenties van parkinsonisme tussen de verschillende landen toont aan dat recenter geïndustrialiseerde landen of streken met minder industrie een lagere prevalentie hebben. Er zijn echter andere studies die juist meer de ziekte van Parkinson vinden in rurale gebieden. De toename van parkinsonisme in rurale en geïndustrialiseerde omgeving wordt vaak toegeschreven aan de aanwezigheid van pesticiden (achtergrondrapport door Prof. M. Viaene, MIRA 2000).

Organofosfaatpesticiden (OPP): De meeste OPP zijn insecticides, maar enkele zijn ook erg toxische zenuwgassen. De toxiciteit bestaat uit een acute fase (met klachten variërend van vermoeidheid over nausea tot convulsies), een intermediair syndroom met spierzwakte, en voor ongeveer 60% van de OPP ook een vertraagde toxiciteit met aantasting van de perifere zenuwen. Door onvolledig herstel blijven er in sommige gevallen restletsels. Het is de vraag of chronische blootstelling aan lage doses OPP, zonder acute intoxicatietekens, een traag evoluerende toxische encefalopathie kan uitlokken, zoals de organische solventen.

Carbamaten: hebben effecten vergelijkbaar met de organofosfaatpesticiden

Organochloorpesticiden: Over de chronische toxiciteit bij de mens is weinig gekend alhoewel ze dezelfde neuro-endocriene effecten hebben als de PCB's (zwakke oestrogenwerking, verminderde ACTH secretie, ...).

1.11.4 Solventen

De geurdrempel voor vele organische solventen is erg laag ('aromaten') en zowel hoge als lage blootstellingen kunnen als trigger functioneren voor het uitlokken van migraine of spierspanningshoofdpijn. De uitwasemingen van solventen en andere chemische stoffen in nieuwbouw zouden verantwoordelijk kunnen zijn voor het 'sick-building' syndroom en de lage milieublootstellingen zouden een aanleiding kunnen zijn tot het gelijkaardige multiple chemical sensitivity syndroom (Rodgers, 1998). Chronische beroepsblootstelling leidt jaarlijks in naar schatting 30 tot 300 personen tot het ontstaan van een chronische toxische encefalopathie (met cognitieve en stemmingsstoornissen) (Viaene, 1997). Hoge blootstelling in niet-beroepsgebonden omstandigheden is echter altijd mogelijk in accidentele situaties of bij bepaalde bouwtechnieken, waarbij soms jaren later nog uitwasemingen meetbaar zijn. Uit de samenvatting van een groot aantal studies blijkt dat organische solventen op één of andere manier een promotierol in het ontstaan van Multiple Sclerose zouden kunnen spelen. Het basismechanisme zou een verhoogde doorgankelijkheid van de bloed-hersenbarrière kunnen zijn, maar ook de immunomodulerende werking van organische solventen. Solventen zouden ook kunnen bijdragen tot het ontstaan van Motor Neuron Disease MND (met

verlammingen). Voor andere neurodegeneratieve aandoeningen (Alzheimer, Parkinsonisme) zijn de literatuurgegevens tegenstrijdig.

1.11.5 PCB's

Neurotoxische effecten van PCB's omvatten spierzwakte, aantasting van de perifere gevoelszenuwen en hoofdpijn bij volwassenen, en vertraagde psychomotorische en cognitieve ontwikkeling alsmede gedragsstoornissen bij kinderen die in utero of als jong kind blootgesteld waren geweest. Dezelfde effecten als bij accidentele blootstellingen werden beschreven en gereproduceerd bij achtergrondblootstellingen in het milieu. Er lijkt geen no-effect level te zijn. In de studie van Patandin (1999) is er een duidelijke afname van globale IQ schalen met stijgende blootstelling in utero, en een duidelijke vermindering in psychische ontwikkeling (meer depressief-apathisch gedrag, minder hoog-niveau spel). Dit wordt bevestigd door de opvolgstudies. Daarbij lijken de gedragsstoornissen niet alleen gebonden te zijn aan de prenatale blootstelling zoals men tot nu toe dacht, maar ook met de postnatale dosis (voornamelijk via borstvoeding). De positieve trofische factoren in borstvoeding lijken dus wel te beschermen tegen het IQ verval, maar niet tegen de gedragsveranderingen ten gevolge van de blootstelling. Het risico op een lagere IQ neemt toe met een factor drie en het IQ verval tussen de hoogste PCB-waarden en de laagste schat men op 6.5 punten. De PCB-lichaamsbelasting in België is vergelijkbaar met deze in Nederland (Staessen et al., 2001; Covaci et al., 2001; Koppen et al., 2002).

Blootstelling aan DDE, PCBs en dioxines kunnen de psychomotorische en/of mentale ontwikkeling verstoren en/of gedragsstoornissen veroorzaken (Ribas-Fito et al., 2003; Siddiqui et al., 2003).

1.12 Puberteit

Over de mogelijke invloed van milieuverontreiniging op de puberale ontwikkeling zijn uiteenlopende bevindingen en bedenkingen gepubliceerd.

In de meeste Europese landen zijn de leeftijd waarbij de puberteit begint en de leeftijd bij de 1^{ste} menstruatie gedaald tijdens de voorbije decennia (Muinich Keizer & Mul, 2001). Dit fenomeen werd geweten aan omgevingsfactoren, mogelijk xeno-oestrogenen. Een Belgische studie toonde aan dat blootstelling aan polygechloreerde aromatische koolwaterstoffen geassocieerd is met vertraagde seksuele ontwikkeling (Den Hond et al., 2002; Staessen et al., 2001). De methodologie en de conclusies van deze studie werden bekritiseerd (Dhooge et al., 2001; Molenberghs et al., 2003).

1.13 Endometriose

Zeker is dat endometriose zeer frequent is. Doordat de diagnose echter in vele gevallen niet gemakkelijk te stellen is, en doordat een lichte graad van endometriose meestal onopgemerkt blijft, is de prevalentie van endometriose niet nauwkeurig gekend. In een Noorse studie werd het risico op endometriose over de gehele levensduur geschat op 2.2% (Moen & Schei, 1997). De meeste cijfers liggen echter heel wat hoger en de prevalentie in de algemene populatie wordt in de meeste westerse landen meestal op ongeveer 10% geschat (Eskenazi & Warner, 1997). Het risico op endometriose stijgt met de leeftijd, binnen de reproductieve periode van het leven. Endometriose zou meer voorkomen in hogere sociale klassen, en minder bij vrouwen die meer kinderen gebaard hebben. In het algemeen zou endometriose minder voorkomen geassocieerd met een levensstijl die de endogene oestrogeen spiegel verlaagt. Het risico zou ook groter zijn bij vrouwen met meer perifeer

lichaamsvet vergeleken bij vrouwen met meer centraal lichaamsvet, en dit zou verband kunnen houden met een hogere oestrogeen spiegel (Eskenazi & Warner, 1997). Het kankerrisico zou iets hoger liggen bij endometriose patiënten (Brinton et al., 1997). Wat een stijging van de incidentie betreft hebben we slechts een beperkte aanwijzing gevonden (Korobowicz et al., 1997).

Dat toxische stoffen bijdragen tot het ontstaan van endometriose wordt onder meer gesuggereerd door de waarnemingen van Baranova et al. (1997): 86.0% van 50 endometriose patiënten bleken geen glutathione S-transferase M1 (GSTM1) enzyme activiteit te hebben, tengevolge van de aanwezigheid van een grote deletie (GSTM1 0/0 genotype), tegen 45.8% in een controlegroep van 72 personen ($P < 0.0001$) overeenstemmend met de frequentie van de GSTM1 deletie in de Franse populatie. Endometriose patiënten blijken dus meer frequent dan andere personen geen glutathione S-transferase 1 (klasse mu conjugerend enzyme behorend tot fase II van het detoxificatie systeem) te hebben. Ook de distributie van GSTM1-actieve genotypes was significant verschillend in patiënten en controle personen ($P < 0.0001$), aangezien geen enkele patiënt het GSTM1A/B genotype, gecorreleerd met de hoogste activiteit van het GSTM1 enzyme, bleek te hebben, daar waar 18.1% van de controlepersonen dit GSTM1A/B genotype vertoonde. Blijkbaar treedt endometriose meer frequent op bij personen die toxische stoffen minder efficiënt ontgiftigen.

Gezien het belang van een oestrogeen klimaat in de pathogenese van endometriose lijkt het logisch te veronderstellen dat xeno-oestrogenen tot endometriose zouden kunnen bijdragen. Vele gechlorideerde industriële substanties en pesticiden hebben een oestrogene activiteit. De oestrogene potentie van afzonderlijke xeno-oestrogenen is in de meeste gevallen echter vrij laag en lijkt zelfs verwaarloosbaar vergeleken bij de fysiologische concentraties (Zeyneloglu et al., 1997). Over de oestrogene impact van combinaties van stoffen is nog onvoldoende gekend. Er zijn echter geen directe aanwijzingen gevonden in de literatuur over de inductie van endometriose door xeno-oestrogene milieuvervuiling.

Dioxine bevordert de groei van endometriose in ratten en muizen na een eenmalige dosis van 3 of 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ lichaamsgewicht (Cummings et al., 1996). Ook andere dioxine-achtige stoffen blijken dit bij muizen te doen (Johnson et al., 1997).

Bij apen stelden Rier et al. (1993) de inductie van endometriose vast door een voeding die 5ppt aan dioxine bevatte, gegeven gedurende 4 jaar, en resulterende in een (door EPA) berekende lichaamsconcentratie van 54 ng/kg lichaamsgewicht. Rier et al. (1995) berichten de inductie van endometriose door een blootstelling van 200.000 pg/kg , gegeven over ongeveer 4 jaar of 1460 dagen, overeenstemmend met 137 $\text{pg}/\text{kg}/\text{dag}$, maar dit over slechts 4 jaar.

De eerste studie die een verband tussen dioxine-achtige stoffen en endometriose bij de mens suggereerde zou die van Gerhard et al. (1992) (geciteerd door Zeyneloglu et al, 1997) zijn die hogere concentraties van PCBs vond in 28 endometriose patiënten dan in 441 andere infertilitiepatiënten (Zeyneloglu et al, 1997).

Mayani et al. (1997) vonden hogere 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin concentraties in het bloed van 44 vrouwen met endometriose dan bij 35 vrouwen met eileiderinfertilitieit. Acht van de 44 endometriose patiënten waren dioxinepositief, met gemiddeld 0,925 ppt, vergeleken bij slechts 1 van de 35 controlepatiënten (0,4 ppt).

Lebel et al. (1998) bestudeerden het plasma gehalte aan 14 gechlorideerde bifenyilverbindingen (ΣPCB), 2 DDT -achtige pesticiden (ΣDDT) en 11 andere gechlorideerde pesticiden (ΣCHL) bij 86 endometriose patiënten en 70 controlepatiënten die eveneens laparoscopie ondergingen voor chronische pijn in het kleine bekken, infertilitieit of "tubal fulguration".

Organochlorine	Endometriose $\mu\text{g}/\text{kg}$ vet	Controle $\mu\text{g}/\text{kg}$ vet
ΣPCB	123.5	119.3
ΣCHL	22.4	22.3
ΣDDT	238.2	229.0

Endometriose patiënten blijken wel iets hogere gehalten te hebben, maar het verschil is statistisch niet significant. Wel gaat het hier om een groep personen met over het algemeen een lage blootstelling. Ook bestaat de kans dat de controlepatiënten, eveneens geselecteerd op problemen in het kleine bekken en infertiliteit, ook aan een endocriene verstoring tengevolge van organochloorverbindingen lijden, net zoals de endometriose patiënten, wat erop zou neerkomen dat men in deze studie twee blootgestelde groepen vergelijkt, die enkel verschillen in het type pathologie dat zij in reactie op de blootstelling ontwikkelden.

Koninckx et al. (1994) legden een verband tussen de hoge incidentie van endometriose in België en de belangrijke pollutie met dioxines. Een recente Belgische studie vond nochtans geen verband tussen PCBs en dioxines en endometriose bij onvruchtbare vrouwen (Pauwels et al., 2001).

Prof. Donnez van de UCL (persoonlijke mededeling) vermoedt een verband tussen voorkomen van endometriose en het wonen, tijdens de adolescentie, in de buurt van belangrijke bronnen van dioxine-emissies.

Significant hogere serum concentraties van Di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) werden beschreven bij vrouwen met endometriosis (Cobellis et al., 2003).

1.14 Schildklierandoeningen

Een recente studie evalueerde de effecten van een intense omgevingsblootstelling aan PCBs en andere organochloorderivaten op de schildklier. Zeer hoge PCBs concentraties werden gevonden in een gepollueerde streek (7300 +/- 871 ng/g vet) in vergelijking met controle personen (2045 +/- 147 ng/g) (Langer et al., 2002). Het volume van de thyroidklier was significant hoger in de verontreinigde streek dan in de controlestreek ($P < 0.001$). Bij mannen uit de verontreinigde streek waren de frequentie van schildklier hypoëchogeniteit, schildkliernodules, aanwezigheid van antithyroid peroxidase antilichamen en abnormale TSH (thyroid stimulating hormone) spiegels hoger dan in mannen uit de controlestreek, terwijl dergelijke verschillen niet werden waargenomen bij vrouwen. Toegenomen schildkliervolume en indicatoren van mogelijke disfunctie van de schildklier waren geassocieerd aan langdurige environmentele blootstelling aan PCBs. Deze effecten op de schildklier werden alleen waargenomen bij individuen met PCB-spiegels boven de 10,000 ng/g vet (schildklier volume) en bij mannen uit de verontreinigde streek (Langer et al., 2003). Accidentele blootstelling aan hexachloorbenzeen werd in verband gebracht met afwijkingen van de schildklier (Witters et al., 2003).

1.15 Cardiovasculaire aandoeningen

Het epidemiologische onderzoek is de laatste jaren verschoven van mortaliteitseffecten naar morbiditeitseffecten en heeft onder andere aangetoond dat geïnhaleerd zwevend stof cardiovasculaire problemen kan veroorzaken of versterken. Men heeft vastgesteld dat bij een verhoogde aanwezigheid van zwevend stof in de lucht de hartfrequentie toeneemt, en de variabiliteit van de hartfrequentie afneemt. Verhoogde PM10 waarden leiden ook tot een verhoogde arteriële druk en een progressie van atheroscleroseletsels. Meer nog, PM10 heeft invloed op verschillende bloedparameters zoals het C-reactieve proteïne (Salvi et al., 1999), het fibrinogeen (Bunn et al., 2001), factor VII (Nemmar et al., 2002a) en de coagulatie (Donaldson et al., 2001, Nemmar et al., 2002b).

Recent is aangetoond dat ultra-fijne partikels na installatie in hamsterlongen of na inademing door proefpersonen reeds voor een deel na 5 minuten terug te vinden zijn in veneus bloed (Nemmar et al., 2001, 2002a). Dit nieuw gegeven werpt uiteraard een ander licht op deze complexe zaak. De systemische effecten zijn dus mogelijk het gevolg van zowel de

pulmonale reactie als van directe effecten van de ultra-fijne partikels. Op dit ogenblik staan we echter nog ver van een volledige verklaring.

Dat verontreiniging van omgevingslucht (voor een deel met dezelfde stoffen als deze aanwezig in tabaksrook) de incidentie van cardiovasculaire aandoeningen doet stijgen is uiteraard zeer waarschijnlijk in het licht van de goed gekende causale relatie tussen tabaksrook en incidentie van cardiovasculaire aandoeningen. Ook staat vast dat lood het risico op arteriële hypertensie kan doen toenemen ("Gezondheidsschadende effecten van milieufactoren", Vlaamse Gezondheidsraad, 2001). Koolstofmonoxyde kan de kans op een hartinfarct doen toenemen (Advies "Gezondheidsschadende effecten van milieufactoren", Vlaamse Gezondheidsraad, 2001).

2 KWANTITATIEVE ASPECTEN: IN WELKE MATE BEDREIGT LUCHTPOLLUTIE DE GEZONDHEID?

2.1 Inleiding en kritische beschouwingen

In welke mate milieuverontreiniging in het algemeen en luchtverontreiniging in het bijzonder de gezondheid bedreigt is een vraag die vandaag niet echt kan beantwoord worden. De normen voor aanvaardbaarheid van pollutanten in omgevingslucht moeten dan ook steeds aanzien worden als compromissen tussen wat zuiver wetenschappelijk wenselijk is, eventueel rekening houdend met het voorzorgsprincipe, en wat sociaal-economisch aanvaardbaar wordt geacht door beslissers. Er dient slechts een beperkte waarde gehecht aan de cijfers die m.b.t. gezondheidseffecten van luchtverontreiniging voorgesteld worden en waarvan sommige hieronder weergegeven zijn. Vooral m.b.t. chronische effecten, zoals de inductie van kanker, zullen deze cijfers een te rooskleurig beeld geven van de werkelijkheid.

2.1.1 Berekening van gezondheidseffecten.

Het is niet mogelijk om de gezondheidseffecten van luchtvervuiling te berekenen uitgaande van de componenten ervan.

- a) De meeste gezondheidsschadende stoffen aanwezig in vervuilde lucht zijn niet als zodanig geïdentificeerd. Van deze die wel geïdentificeerd zijn is het pathogeen vermogen slechts zeer benaderend bekend. Voor kankerverwekkende potentie, bijvoorbeeld, zal die onzekerheid, bij lage dosis zoals deze uit blootstelling aan omgevingslucht voortvloeit, minstens een factor honderd bedragen. De cijfers die door grote instellingen en internationale instanties worden vooropgesteld zijn compromissen tussen de opinies van een aantal betrokken specialisten. Steeds verdedigen sommige van die specialisten de visie van industriële belangengroepen. Een schoolvoorbeeld terzake is het debat omtrent het kankerverwekkend vermogen van benzeen.
- b) Blootstelling aan luchtpollutie gebeurt uiteraard niet aan één of ander agens afzonderlijk, maar betreft steeds complexe mengsels. De interacties tussen deze agentia zijn niet gekend, en nagenoeg totaal ontoegankelijk voor experimentele studie.

2.1.2 Epidemiologische studies

Hoewel epidemiologische studies een waardevol instrument zijn voor globale evaluatie op bevolkingsniveau, zijn ze in het bijzonder minder gevoelig en zullen, in het algemeen, tot een onderschatting van de werkelijke gezondheidseffecten voeren.

- a) Men beschikt nooit over een echte controlepopulatie. Negatieve confounding is vermoedelijk een zeer belangrijk fenomeen. Sommige pathologieën, die bijvoorbeeld kunnen geïnduceerd worden door PAKs in omgevingslucht, zouden ook kunnen geïnduceerd worden door PAKs of andere polluenten in voeding. Een aanwijzing voor het belang van dit fenomeen wordt gegeven door het feit dat Zweedse onderwijzers in de periode 1961-1979, na correctie voor het confounding effect van tabaksrook, een RR van 0,48 vertoonden voor longkanker (Carstensen et al., 1988). Dit impliceert dat de algemene populatie, die dikwijls als controlegroep genomen wordt in epidemiologische studies, in feite zelf een risicopopulatie was met een RR van 2,1. Daarbij dient bedacht dat onderwijzers heel veel blootstellingen met de algemene populatie delen. Ook de gegevens inzake inwendige dosissen uit de Vlaamse Milieu- en Gezondheidstudie geven een aanwijzing voor het feit dat negatieve confounding een belangrijk element kan zijn. Vrouwen (50-65jaar) uit Peer, gekozen als controlegebied, bleken eerder een hogere inwendige blootstelling aan polluenten te hebben dan vrouwen uit Antwerpen
- b) Bij het berekenen van de globale gezondheidseffecten van milieuvervuiling worden enkel blootstellingen waarvan de gezondheidseffecten "bewezen" of bijna bewezen zijn in rekening gebracht. Helaas laten epidemiologische studies slechts zelden toe risicofactoren leidend tot relatieve risico's kleiner dan 1,5 à 2 te detecteren (Ehrenberg et al., 1996). Dit heeft tot gevolg dat een groot aantal milieufactoren eenvoudigweg niet in rekening kan gebracht worden. Toch zijn er een aantal waarnemingen die erop wijzen (zonder tot een echt bewijs te kunnen voeren) dat environmentele blootstellingen aan één of andere klasse van polluenten (zoals blootstelling aan pesticiden) op zich reeds tot een belangrijke stijging van het relatief risico lijdt (Alexander et al., 2001). Mocht men de som kunnen maken van de impact van alle dusdanig reeds geïdentificeerde waarschijnlijk gezondheidsbeschadigende factoren zou het resultaat veel hoger liggen dan de enkele procenten van kankersterfte of van vroegtijdige sterfte in het algemeen die men nu in de inschattingen terug vindt.
- c) De synergistische actie van tabaksrook met moeilijk te identificeren beroeps- en omgevingsfactoren heeft mogelijk geleid tot een aanzienlijke onderschatting (Kvale et al., 1986) van het effect van deze laatste: veel tabaksrook-gerelateerde kankers kunnen mede onder invloed van carcinogene agentia uit arbeidsmidden of leefmilieu ontstaan zijn.
- d) In studies waarin naar een dosis-antwoord verband wordt gezocht, zullen onnauwkeurigheden in het bepalen van de blootstelling (en deze zijn legio) leiden tot een onderschatting van de stijging van het risico (Freudenheim & Marshall, 1988; Grandjean P et al. (2003)). Een bijzonder probleem m.b.t. de dosis-gezondheidseffect relatie is dat het de persoonlijke dosis van de studiesubjecten is die telt. Die persoonlijke dosis is echter maar benaderend gekend als men, zoals in bijna alle studies werkt met metingen op de omgevingslucht. Persoonlijke blootstellingen aan ozon, NO₂, SO₂ en CO vertoonden slechts een zwakke correlatie met omgevingsconcentraties, voor PM_{2,5} was de correlatie wel significant (Sarnat et al., 2001). De ruwe correlatie tussen omgevingsconcentraties van NO₂ en persoonlijke blootstelling was pover in alle onderzochte Franse steden ($r^2 = .009$ voor Grenoble, $r^2 = .04$ voor Toulouse, en $r^2 = .02$ voor Paris), (Gauvin et al. 2001).
- e) De blootstelling aan veel polluenten, die primaire luchtpolluenten zijn zoals de polycyclische aromatische koolwaterstoffen, grijpt hoofdzakelijk via de voeding plaats (Phillips, 1999). Deze blootstelling zal wellicht minder belangrijk zijn in termen van pathogene effecten op het ademhalingsstelsel zelf, maar kan wel belangrijker zijn voor andere organen. Voor tabaksrook zou de verhouding tussen gevallen van longkanker en andere vormen van kanker 10.000 op 6.000 (10/6) zijn in Scandinavische landen (Dreyer et al., 1997). Er is geen reden om te veronderstellen dat die verhouding voor andere PAK-houdende vormen van pollutie substantieel verschillende zou zijn.

2.2 Cijfergegevens in verband met gezondheidsschade

Enkele becijferde gegevens, betreffende mogelijke gezondheidsschade in relatie met blootstellingsroute en de gemeten stofconcentraties in het milieu, risicogebieden en risicopopulaties volgen in tabel 3 hierna. Men dient daarbij te bedenken dat verschillende stoffen synergistisch op elkaar inwerken en dat lage concentraties van een groep verschillende stoffen een groter effect kunnen hebben dan de som van de effecten van de afzonderlijke polluenten.

Tabel 3: Gegevens uit MIRA scenario rapport (2000).

Polluent	Mogelijke schade-lijke effecten	Milieu compartiment waarlangs inname gebeurt	Meetwaarde in dat milieucompartiment in Vlaanderen (1)	Richtwaarde of norm=(2) EU achtergrondwaarde =(3)	Waarde waarboven effect optreedt > 1/100 000 kankers (4) of LOAEL (5)	Verwacht effect in Vlaanderen bij meetwaarde in milieu opgegeven in kolom 4 (6)	Risico gebied/ overschrijding van gezondheidsnorm in 1998 (7)	Risicogroep
As	kanker: huid long IARC1	lucht	0,01-0,06 µg/m ³ zwevend stof	0,001-0,03 µg/m ³ (3*)	0,007 µg/m ³ (4) WHO-99	huid en longkanker 1,4- 8,6/ 100 000	rond non ferro industrie/ gans Vlaanderen	algemene bevolking
	kanker	bodem	9 mg/kg ds (0,4-443)	110 (45) mg/kg ds (2)	TRfD= 2 µg/kg dag FAO-WHO (4)	kankers: < 4 /100 000	rond non - ferro	
		voeding	?	0,4-118 mg/kg (3)		?	?	
	kanker	drinkwater	12 µg/l	10 µg/l (2)	0,17 µg/l WHO (4)	Kanker	?	
Cd	longkanker IARC1	lucht	0,01-0,02 µg/m ³ zwevend stof	0,0001-0,02 µg/m ³ (3*)	0,005 µg/m ³ (4) EPA-1996	2-4/100 000	non-ferro industrie stad verkeersassen in gans Vlaanderen	oudere vrouwen
	nierschade botschade	bodem	1 mg/kg ds (<dl - 71)	6 (2)mg/kg ds (2)	TDI = 1 µg/kg dag 2,5 µg Cd / g creatinine (5*)	nierschade		
		drinkwater	0,5 µg/l	3 µg/l (2)		geen		
		voeding	23 µg/kg in paling	10 µg/kg (3) 50 (2*)		?		
		lucht	0,01-0,02 µg/m ³ zwevend stof	0,005 µg/m ³ WHO(2)		nierschade		
Cr	longkanker IARC1	lucht CrVI	?	0,005-0,2µg/m ³ (3*)	0,001µg/m ³ C rVI WHO(4)	?	Rond ferro-industrie	
	astma/ allergie	bodem CrIII	15mg/kg ds 0,8-616	300 (130) mg/ kg ds (2)	1,5mg/kg.d EPA CrIII (4)	geen voor CrIII CrVI?		
		voeding	?	10-1300 µg/kg (3**)	10 mg/ kg l.wt CrVI(5*) sensitatisatie	?		

Polluent	Mogelijke schadelijke effecten	Milieu compartiment waarlangs inname gebeurt	Meetwaarde in dat milieucompartiment in Vlaanderen (1)	Richtwaarde of norm=(2) EU achtergrondwaarde=(3)	Waarde waarboven effect optreedt > 1/100 000 kankers (4) of LOAEL (5)	Verwacht effect in Vlaanderen bij meetwaarde in milieu opgegeven in kolom 4 (6)	Risico gebied/ overschrijding van gezondheidsnorm in 1998 (7)	Risicogroep
Cu	Levercirrose	voeding	?	2-100 mg/kg (3)		?	verkeer non-ferro-Industrie	
		drinkwater	16 µg/l	2 g/l (2)WHO		geen		
Hg	Neurotoxiciteit nierschade huidallergie kanker (methylkwik 2B)	drinkwater	0,95 µg/l	1 µg/l (2)	urine: nierschade >50 µg Hg/g creatinine gedrag-schade: >36 µg/l urine (5**)	geen	energiesector Chemie-Industrie	kinderen
		(vis)	61 µg/kg in paling	1000 µg/kg (2*)		Geen		
		lucht	?	1 µg/m ³ (2)		20 µg/m ³ LOEL (WHO-99)		
Ni	longkanker IARC1 metallisch Ni-IARC2B allergie/astma	lucht	0,01-0,05 µg/m ³		0,026 µg/m ³ (4)	Genk Hoboken Olen Reppel <2/100 000	Industrie-chemie raffinage staal non ferro/ Genk Hoboken Olen Reppel	
		voeding	?	0-10 mg/kg (3**)	?	?		
Pb	Neurotoxiciteit anemie kanker IARC2B	drinkwater	2 µg/l 188 µg/kg in paling	10 µg/l (2)	bloed: (5) >10 µg/dl bij kinderen > 25 µg/dl bij volwassenen (WHO-99)	Neurotoxiciteit	metaalindustrie ferro non ferro industrie/ Hoboken Beerse	kinderen
		bodem stof/	28 mg/kg ds <dl-1075	700(200) mg/kg ds (2)				
		lucht	0,05 -1,8 µg/m ³	0,5 (2)µg/m ³				
Zn	Cu deficiëntie Immuno toxiciteit	bodem vlees/ vis	voeding?	5-50 mg/kg (3**)	TDI= 1 mg/kg (3**)	?	non-ferro industrie	

Opmerkingen: voor de metalen hangt de toxiciteit vooral af van de aard van de verbinding

Vb:

- arsenicum: organische verbindingen worden beter opgenomen dan anorganische, evenals de oplosbare oxides en arseniet
- Chroom VI verbindingen zijn veel meer toxisch dan Cr III verbindingen
- Koper II is meer toxisch dan koper I
- Organische kwikverbindingen en kwikzouten worden meer opgenomen
- Ni: gemakkelijk oplosbare verbindingen zoals Ni sulfaat en Ni carbonyl zijn meer biobeschikbaar
- Loodacetaat, loodfosfaat, gasvormig loodoxide en organische loodverbindingen behoren tot de meest giftige loodverbindingen

Polluent	Mogelijke schadelijke effecten	Milieu compartiment waarlangs inname gebeurt	Meetwaarde in dat milieucompartiment in Vlaanderen (1)	Richtwaarde of norm=(2) EU achtergrondwaarde=(3)	Waarde waarboven effect optreedt > 1/100 000 kankers (4) of LOAEL (5)	Verwacht effect in Vlaanderen bij meetwaarde in milieu opgegeven in kolom 4 (6)	Risico gebied/ overschrijding van gezondheids norm in 1998 (7)	Risicogroep
PAK's Bap als gidsstof	Kanker IARC 2A	lucht	Zwevend stof 0,2-0,35 ng/m ³	<1ng/m ³ (3*)	0,11 ng/m ³ (4)	3-5/ 100 000	gans Vlaanderen	
		bodem	100 µg/kg ds	500(500) µg/kg ds (2)	500 µg/kg ds (4)			
Dioxines TCDD als gidsstof	Neurologische ontwikkeling hormonale en immunologische effecten Kanker: Dioxines IARC1	melk	1,7 +/- 0,6 pg/ g melkvet	5 pg TEQ/g melkvet (2*)	10-30 pg TEQ/g lichaamsvet (5***) TDI= 1-4 pg TEQ/kg dag (5***) 0,06 pg TEQ/ kg.dag (4) EPA 0,0013 pg TEQ/kg.dag (4*)	?	ferro en non ferro industrie verbrandings ovens	kinderen
		bodem	?	?				
PCBs	Kanker: PCBs =IARC2A	melk	36+/-32 ng/g vet	200 ng/g vet (2*)	?	?	?	
		bodem	?	?	?	?	?	
Ben-zeen	Bloedkanker IARC1	lucht	2-8 µg/m ³	5-20 µg/ m ³ (3*)	1,3-2,3 µg/m ³ WHO-99 (4) 0,83 µg/m ³ (4**)	0,9-6 / 100 000	verkeer industrie	
1,2 dichloor ethaan	Neurotoxiciteit Kanker IARC2B	lucht	0,1-3,4 µg/m ³	0,07-4 µg.m ³ (3*)	3,6-20µg/m ³ WHO99-(4)	neen	chemie	
		drinkwater	?	30 µg/l (2)	30 µg/l			
CFKs	Kanker	UV straling lucht	0,42 % daling dikte ozonlaag per jaar		1,2 % stijging huidkanker per 1% daling dikte ozonlaag	0,5 % stijging huidkankers / jaar	buitenhuis, in de zon	buitenarbeiders, kinderen
Ozon	Longfunctie vermindering hospitaal opname	lucht	tot 210 µg/m ³ 8 uur waarde	120 µg/m ³ 8 uur waarde (2)	minstens 3% daling FEV1 bij overschrijding > 120µg/m ³ WHO99-(4)	9 effect dagen per persoon (2) in 1998	landelijk	ouderen buitenhuis bij inspanning

Polluent	Mogelijke schadelijke effecten	Milieu Compartiment waarlangs inname gebeurt	Meetwaarde in dat milieucompartiment in Vlaanderen (1)	Richtwaarde of norm=(2) EU achtergrondwaarde=3	Waarde waarboven effect optreedt > 1/100 000 kankers (4) of LOAEL (5)	Verwacht effect in Vlaanderen bij meetwaarde in milieu opgegeven in kolom 4 (6)	Risico gebied/ overschrijding van gezondheidsnorm in 1998 (7)	Risicogroep
Bestrijdingsmiddelen linaan atrazine methoaat etc	Kanker Hormoon Verstoring Allergie Neuro- Toxiciteit	Drinkwater	atrazine 0,02 µg/l	2 µg/l (2) 0,01-5 µg/l (3)	?	overschrijding in oppervlaktewater	?	Algemene bevolking
		voeding	linaan	10 µg/kg (3)	?	?	?	
nitraten	Blauw- ziekte	Drinkwater	18 mg/l	50 mg/l (2)	TDI= 50 mg/l (5)	> 13 % metingen	putwater	babies < 3 maand
	Maag- kanker							

(1) gebaseerd op meetgegevens uit Vlaanderen van MIRA-T 1998-1999

- lucht: minimum – maximum van de jaargemiddelde concentratie, voor ozon wordt de maximale 8 uur waarde die werd gemeten opgegeven (VMM rapport: Luchtkwaliteit in het Vlaams gewest, 1998)
- bodem: mediaan (minimum-maximum) concentraties (gegevens uit Vito bodem databank) -drinkwater: maximale waarde gemeten bij analyse van gedistribueerd drinkwater (alleen gegevens bekomen van AWW, 1998 en PIDPA 1999)
- voeding : concentraties in dieren, planten, gegevens uit MIRA 1999
- dioxines en PCBs in voedinggegevens 1999-2000 zie ook paragraaf "dioxines en PCBs " dit rapport

(2) –richtwaarde afgeleid door de WHO: hoogste concentratie waarbij geen schadelijk effecten te verwachten zijn als de algemene bevolking er levenslang aan blootgesteld is
-norm: bodemsaneringsnorm van VLAREBO voor bestemmingstype III wonen, deze norm komt overeen met de hoogste concentratie in de bodem die een blootstelling geeft waarbij geen schadelijke effecten te verwachten zijn, ter vergelijking is tussen haakjes ook de bodemsaneringsnorm voor bestemmingstype II landbouw aangegeven. De norm voor type II is lager dan die voor type III omdat bij bestemmingstype II de blootstelling verhoogt ten gevolge van gebruik van putwater als drinkwater (100%) en van lokaal gekweekte groenten (50%), vlees (50%) en zuivel (100%). Dit in tegenstelling met verbruik van 25% lokaal gekweekte groenten bij bestemmingstype III.
dl= detectie limiet

(2*) maximale toegelaten gehalten in voedingsmiddelen

-zware metalen (gegevens voor paling) KB 92-646 (2/12/91) - dioxines en PCBs (KB31/12/99)

(3) achtergrondwaarde gemeten in EU- WHO 1995

*WHO guidelines for air quality, 1999, Geneva

**WHO- water quality guidelines, 1996

meer dan 1/100 000 kankers extra verwacht bij levenslange blootstelling aan opgegeven concentratie: in µg/m³ voor lucht, in µg/l voor water

(4*) hoogste schatting: Becher et al, 1998, Env. Health Perspectives, 106, 663-670.

(4**) risicoschatting : N. Van Larebeke , VMM rapport 1995

(5) Lowest Observed Adverse Effect Level (LOAEL)voor niet-carcinogene eindpunten dit is de laagste concentratie waarbij schadelijke effecten worden waargenomen bij levenslange blootstelling aan deze concentratie

* uit Scand. J. Work Environ. Health, 1998,24,S1: 1-52.

**uit MRC , 1997, IEH report R7, health effects of waste combustion products

*** uit WHO-ECEH, ICPS, Assessment of the health risk of dioxins: re-evaluation of the tolerable daily intake (TDI), 25-28 may 1998, Geneva, Switzerland.EHBI 010201 sept 99.

(6) Gebaseerd op gemeten waarden in lucht, bodem of water in Vlaanderen en op de risico-eenheden voor carcinogene effecten (WGO) en op overschrijdingen van de LOAEL (WGO) voor niet-kanker effecten

(7) Gebaseerd op gegevens uit MIRA-T en VMM rapport: Luchtkwaliteit in het Vlaams gewest, 1998

2.3 De stedelijke omgeving

(overgenomen uit het MIRA scenario rapport 2000)

Grootschalige epidemiologische studies (APHEA, PEACE) hebben kwantitatieve verbanden gelegd tussen stedelijke pollutanten en **korte termijn gezondheidseffecten**. Bij korte episodes (24 uur) van luchtvervuiling worden bestaande gezondheidsproblemen zoals chronisch obstructief longlijden en astma ernstiger. Longfunctiedalingen worden waargenomen. Er zou ook een verlaagde drempel zijn voor respiratoire allergie. Vooral gevoelige individuen worden getroffen. Vaak zijn dit astmalijders, jonge kinderen, CARA patiënten. Een verhoging van hospitaalopnames, onmiddellijk na deze episodes, is een goede indicator voor de toegenomen gezondheidsschade. Ook het aantal sterftes neemt toe tijdens of kort na episodes van luchtvervuiling. Ouderen met reeds verzwakte hart- en longfuncties vormen de belangrijkste slachtoffers waarbij een verkorting van de levensverwachting met enkele dagen tot weken wordt geschat.

De gemeten pollutanten dienen beschouwd te worden als indicatorstoffen voor de luchtverontreiniging. Uit sommige analyses blijkt wel dat de effecten van PM₁₀, ozon en SO₂ onafhankelijk zijn. Voor NO₂ is dit minder duidelijk. Voor PM₁₀, PM_{2,5}, SO₂ en ozon blijkt er geen drempelwaarde waar beneden effecten niet voorkomen. Voor deze stoffen wordt er een lineair dosis-antwoord verband verondersteld en er wordt een risico-eenheid opgegeven (APHEA studie) die het percentage effect toename aangeeft per stijgende concentratie eenheid (µg/m³).

Naast de korte termijn effecten zijn er ook gegevens over **chronische gezondheidseffecten** oa. toename aan longkanker, langdurige vermindering van longfunctie. Een kwantitatief verband met de gemeten jaarconcentraties van luchtvervuiling is nog veel minder duidelijk. Enkele Amerikaanse cohorte studies vinden een significant verband tussen lange termijn blootstelling aan zwevend stof (vooral PM_{2.5} en sulfaten) en vervroegde sterfte (MIRA 2000). In Europa is er op dit vlak nog geen onderzoek gebeurd. Ook bronchitis als gevolg van langdurige blootstelling aan PM₁₀ wordt mogelijk geacht. De vermindering in levensverwachting ten gevolge van chronische blootstelling wordt geschat op 1 jaar (resultaten Nederland –Brunekreef 1997).

Tabel 4 geeft maximale meetwaarden aan voor Vlaanderen in de meetperiode 1998-1999. De VMM groepeert ook de resultaten van de meetstations per gebied en berekent zo gemiddelde waarden voor een meetstation in een industrieel gebied, een stedelijk en een voorstedelijk gebied en een landelijk gebied. Als men per gebied de bevolkingsgegevens aanbrengt dan kan men, rekening houdend met de risico-eenheden die gegeven werden in tabel 3, het aantal sterftes en hospitaalopnames berekenen die geassocieerd zijn met de luchtverontreiniging. Een samenvatting van deze inschatting wordt gegeven in tabel 5.

Tabel 4: Indicatoren van vervuiling in stadslucht en potentiële gezondheidseffecten

Polluent	Maximale meetwaarde in Vlaanderen $\mu\text{g}/\text{m}^3$ - 1998	Observatietijd	Gezondheidseffect	Richtlijn-WHO $\mu\text{g}/\text{m}^3$
NO₂	208	Uur	Toename sterfte en hospitaalopnames ↓ Longfunctie bij astmapatiënten	200
	42	jaar		40
SO₂	Niet gemeten	10 min	↓ Longfunctie bij astmapatiënten	500
	206	24 uur	toename: sterfte hospitaalopnames astmasymptomen	125
	11-35 (2)	jaar	erger worden van luchtwegontstekingen in gevoelige individuen	50
PM10	233	24 uur	toename: sterfte hospitaalopnames astmasymptomen	50 (1)
	36 (Evergem)	jaar	verhoogd optreden van chronische longproblemen (hoesten, bronchitis)	30 (1)

(1) EU- voorstel voor grenswaarde 2005

(2) = uiterste meetwaarden op verschillende locaties

Tabel 5: Kwantitatieve schatting van gezondheidseffecten

Toename van gezondheidsschade	Polluent-observatietijd	% toename per stijging met 10 µg/m ³ +/- 95% Conf. limits APHEA risk unit
Acute effecten		
Vervroegde sterfte: cardiovasculair + Respiratoir	PM10-24uur	0,4 (0,2-0,6) (1)
	SO ₂ -24 uur	0,6 (0,4-0,8)
	NO ₂ -uur	0,3 (0,2-0,6) (2)
	Ozon- 8-uur	0,6 (0,0- 0,9) (2)
Hospitaalopnames Te wijten aan ademhalingsproblemen (3)	BS-24 uur	0,6 (0,1-1,0) bij 15-65 jarigen 0,4 (0,0-0,9) bij + 65 jaar
	SO ₂ -24 uur	0,2 (0,0-0,5) bij 15-65 jarigen 0,4 (0,1-0,9) bij + 65 jaar
	NO ₂ -24 uur	0,2 (0,0-0,7) bij 15-65 jarigen 0,4 (0,0-1,2) bij + 65 jaar
	Ozon- 8 uur	0,6 (0,3-1,0) bij 15-65 jarigen 0,8 (0,4-1,2) bij + 65 jaar
Hospitaalopnames te wijten aan astma (4)	BS -24 uur	0,6 (0,0-1,7) < 15 jaar 0,4 (0,0-1,2) bij 15-64 jaar
	SO ₂ -24 uur	1,5 (0,5-2,5) < 15 jaar
	NO ₂ -24 uur	0,6 (0,1-1,1) bij + 65 jaar
Chronische effecten		
Vervroegde sterfte door langdurige blootstelling (5)	PM _{2.5} - jaar	2(1-4)
Chronische bronchitis (6)	PM10- jaar	29 (0-83)

(1) Katsouyanni et al, 1997, BMJ, 314,1658-1663

(2) Touloumi et al, 1997, Am. J. Ep, 146, 2, 177- 185

(3) Spix et al, 1998, Arch. Env. Health , 53, 54-64

(4) Sunyer et al, 1997, Thorax, 52, 760-765

(5) WHO-1999

(6) Dockery et al. 1996, Environ Health Persp; 104: 500-505

2.4 Associatie van luchtpollutie met kankerrisico

Een mannelijke vrachtwagenbestuurder blootgesteld aan 5µg/m³ van het element koolstof (een typische blootstelling voor het jaar 1990, ongeveer 5 maal de toenmalige stedelijke achtergrond waarde) zou een levenslang risico op longkanker lopen van 1 à 2%, bovenop het achtergrondrisico van 5% (Steenland et al., 1999).

Bestuurders van bussen en trampersoneel hebben een verhoogd totaal risico op kanker (alle kankers). (standardised incidence ratio (SIR) 1.24, 95% confidence interval (95% CI) 1.19 tot 1.30). Het relatieve risico was significant verhoogd voor zowel mannen als vrouwen (SIR 1.24, 95% CI 1.19 tot 1.30 en 1.28, 1.06 tot 1.53, respectievelijk). Personen die minder dan 3 maand tewerkgesteld waren vertoonden geen verhoogd risico op kanker (1.04, 0.81 tot 1.31). Voor mannen langer dan 3 maand tewerkgesteld was het risico op longkanker (1.6, 1.5 tot 1.8), larynxkanker (1.4, 1.0 tot 1.9), nierkanker (1.6, 1.3 tot 2.0), blaaskanker (1.4, 1.2 tot 1.6), huidkanker (1.1, 1.0 tot 1.2), pharynxkanker (1.9, 1.2 tot 2.8), rectumkanker (1.2,1.0 tot 1.5) en leverkanker (1.6, 1.2 tot 2.2) significant verhoogd. Voor vrouwen langer dan 3 maand tewerkgesteld was het risico op longkanker (2.6, 1.5 tot 4.3) verhoogd op significante wijze. Deze verhoogde risico's kunnen te wijten zijn aan professionele blootstelling aan luchtpollutie en/of aan andere risicofactoren, voornamelijk tabaksrook (Soll-Johanning et al., 1998).

Een case studie inzake het effect van uitlaatgassen van voertuigen op kanker bij kinderen toonde dat een gemiddelde stikstofdioxide concentratie (maat voor blootstelling aan uitlaatgassen) van groter of gelijk aan 50 µg/m³ in de buitenlucht geassocieerd was aan een relatief risico van 2,7 (95% CI 0,9-8,5) vergeleken met een situatie waarbij de buitenlucht

minder of gelijk aan $39 \mu\text{g}/\text{m}^3$ was. Bij NO_2 concentraties groter of gelijk aan $80 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bedroeg het RR 3,8 (CI 1,2-12,1) (Feychting et al., 1998)

In een prospectieve cohort studie werd het effect van luchtpollutie op totale mortaliteit nagegaan, onder controle van individuele risico factoren. Een overlevingsanalyse werd uitgevoerd op 8111 volwassenen in 6 steden van de USA. Na correctie voor roken en andere risicofactoren werd een statistisch significante en robuuste associatie waargenomen tussen luchtpollutie en mortaliteit. De gecorrigeerde mortaliteitsverhouding voor de meest gepollueerde stad vergeleken met de minst gepollueerde was 1,26 (95% confidentie interval 1,08 tot 1,47). Luchtpollutie was positief geassocieerd met sterfte tengevolge van longkanker en cardiopulmonaire aandoeningen maar niet met sterfte tengevolge van andere oorzaken samen beschouwd. Mortaliteit was het sterkst geassocieerd met verontreiniging met kleine partikels, waaronder sulfaten (Dockery et al., 1993).

Een onderzoek naar de doodsoorzaak in 13 districten van de Shandong provincie van China, op een bevolking van 8,1 miljoen personen, toonde aan dat de naar leeftijd gestandaardiseerde mortaliteit tengevolge van longkanker in de periode 1985-1989 96,7% hoger was dan in de periode 1970-1974. Een correlatie analyse toonde een associatie met de graad van luchtvervuiling (Li et al., 1994).

De landelijke Beicun streek nabij de stad Datong (China) werd vergeleken met de landelijke Hua yuan tun streek. Beicun is meer verontreinigd dan Hua yuan tun, met meer nitraat en nitriet in drinkwater en vijf soorten groenten, hogere serum koper waarden bij inwoners van Beicun en meer benzo(a)pyreen en meer stof in de lucht. De kankersterfte was beduidend hoger in Beicun (117.04/10(5)) dan in de controle groep (61.06/10(5)) (Han et al., 1995).

In Taiwan zijn vele streken sterk verontreinigd. De jaargemiddelde concentratie aan PM10 partikels bedroeg er in 1994 $70 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Wonen in de nabijheid van industriezones bleek geassocieerd te zijn aan hogere risico's op sterfte tengevolge van verschillende types van kanker en op ziekten van het ademhalingsstelsel (Ko, 1996).

In Noord-Italië werd een correlatie waargenomen tussen verminderde diversiteit van korstmossen, fenomeen dat geassocieerd is aan een hogere intensiteit van luchtpollutie, en mortaliteit door longkanker (Cislaghi & Nimis, 1997).

Volgens Hemminki en Pershagen werd in epidemiologische studies in vele landen, na het aanbrengen van correcties voor roken, een tot 1,5 maal hogere longkankerincidentie gedetecteerd in stedelijke populaties vergeleken met landelijke populaties (Hemminki & Pershagen, 1994). Deze waarneming is een aanwijzing voor de belangrijke inwerking van stedelijke luchtpollutie; een RR van 1,5 zou overeenstemmen met een "attributable risk" van ongeveer 33%, en dit voor een zeer frequente tumor! In de Scandinavische landen, waar 7,3 miljoen mensen in stedelijke gebieden leven, zou een RR=1,5 neerkomen op 1800 gevallen van longkanker per jaar (Dreyer et al., 1997), overeenstemmend met een levenslang risico van ongeveer 1,7%. Barbone et al.(1995) stelden vast dat, in de streek van Trieste, inwoners van het stadscentrum 2,5 maal meer risico op sterfte tengevolge van longkanker liepen dan inwoners van landelijke gebieden, dit na correctie voor leeftijd, rookgewoonten, waarschijnlijkheid van blootstelling aan carcinogenen op de arbeidsplaats, en sociale groep. In het stadscentrum van Trieste was vooral het risico op "small cell carcinoma" (RR=2,0 vergeleken met een residentiële wijk) en "large cell carcinoma" (RR= 2,6 vergeleken met een residentiële wijk), terwijl in de industriële zone van Trieste vooral het risico op adenocarcinoma was toegenomen (RR=2,0 vergeleken met een residentiële wijk) (Barbone et al.1995). Het risico op longkanker was duidelijk verbonden met het stadscentrum ($p = 0.0243$), met een bijkomend relatief risico (excess relative risk) bij afstand nul gelijk aan 2.2 en een geleidelijke afname naarmate de afstand tot het centrum groter is (-0.015), en met de verbrandingsoven ($p = 0.0098$), met een bijkomend relatief risico (excess relative risk) van 6.7 bij de bron en een scherpe afname met toenemende afstand (-0.176) (Biggeri et al. 1996). Dat de toename in Non-Melanoma huidkanker (NMSC) incidentie in de laatste twee decennia te wijten is aan de afname van de ozonlaag wordt door sommigen betwijfeld, gezien de lange latentietijd (20 tot 30 jaar) van UV effecten op de huid. De gegevens inzake het actiespectrum voor inductie van NMSC suggereert dat een afname van 1% in de stratosferische ozon aanleiding geeft tot een toename, bij evenwicht, van 2% in de incidentie

van NMSC. De aanwijzingen inzake de rol van blootstelling aan UV in het ontstaan van Malign Melanoma zijn minder overtuigend. Er wordt geschat dat een afname van 1% in de stratosferische ozon aanleiding geeft tot een toename, van 0,6% in de incidentie van malign melanoma (Urbach, 1997).

In een vervolg van de ACS studie worden de associaties van langdurige blootstelling aan PM_{2,5} met vervroegde sterfte bevestigd en verfijnd (Pope et al., 2002). In de nieuwe studie wordt uitgebreider rekening gehouden met verstoringsfactoren, en wordt een meer verfijnde statistiek en een dataset over 16 jaar gehanteerd. Op basis van de verschillen in blootstelling aan PM_{2,5} in verschillende steden komt men tot een verhoogd risico van 8% voor longkanker toe te schrijven aan een verhoging met 10 µg/m³ PM_{2,5}.

2.5 Effecten van luchtpollutie op de longen.

De effecten van stofdeeltjes <10 µm in aërodynamische diameter (PM₁₀) en andere luchtpolluenten op de longfunctie werden gemeten bij 975 schoolkinderen, van 8 gemeenten in Laag Oostenrijk in de periode 1994-1997. Na correctie voor potentiële beïnvloedende factoren (confounders) (sex, atopie, passief roken, lengte bij aanvang, lengtegroei, plaats, initiële longfunctie) bleek een toename in Zomer PM₁₀ met 10 µg/m³ geassocieerd te zijn met een vermindering in "forced expiratory volume in one second" (FEV₁) groei van 84 ml/jaar. De vermindering in de groei van de "midexpiratory flow" tussen 25 en 75% van de geforceerde vitale capaciteit (forced vital capacity) (MEF₂₅₋₇₅) bedroeg 329 ml/s/jaar. Stikstofdioxide en ozon toonden ook een negatief effect op de groei van de longfunctie, wat vroegere waarnemingen bevestigde. De auteurs concludeerden dat langdurige blootstelling aan stofdeeltjes <10 µm in diameter een significantief negatief effect had op de longfunctie proxies voor de ontwikkeling van grote ("forced expiratory volume in one second") en kleine ("midexpiratory flow" tussen 25 en 75% van de geforceerde vitale capaciteit, MEF₂₅₋₇₅) luchtwegen, respectievelijk, met een sterke aanwijzing voor een bijkomend effect van ozon en stikstofdioxide op de ontwikkeling van de geforceerde vitale capaciteit en "forced expiratory volume in one second". (Horak et al. 2002)

- 174 kinderen (5-17 jaar oud) van Zuidwest "Metropolitan" Mexico City werden vergeleken met 27 controle kinderen die in weinig gepollueerde streken woonden. Controle kinderen hadden geen lesies in de neus, en slechts één kind vertoonde een abnormale RX thorax. De kinderen uit Zuidwest "Metropolitan" Mexico City vertoonden afwijkingen in de neus (22%), hyperinflatie (67%), interstitiële afwijkingen (49%), en een patroon van milde restrictie bij spirometrie (10%) (Calderon et al., 2003)
- In een centrale lagere school in de hoofdstad van Boven Oostenrijk ondergingen kinderen (leeftijd 7-10 jaar) herhaalde longonderzoeken (vragenlijsten, dagboeken, spirometrie). Tussen maart en mei 2001 werden de dagelijkse gemiddelden van de signalen van een "diffusion charging sensor", die de "actieve oppervlakte" van deeltjes in suspensie meet, en van een foto-elektrische aërosol sensor die de partikel-gebonden polycyclische aromatische koolwaterstoffen meet, gerelateerd aan de spirometrische resultaten van alle 164 onderzochte kinderen en aan de dagelijkse symptomenscore van een meer gevoelige subgroep. Significante verminderingen van de geforceerde vitale capaciteit ("forced vital capacity") ($p=0.006$) en geforceerd expiratoir volume in de eerste seconde ($p=0.001$) en een significante toename in wheezing (piepen) ($p=0.001$), kortademigheid ($p=0.041$), avondlijk hoesten ($p=0.031$) en nachtelijk hoesten ($p=0.018$) werden waargenomen in samenhang met een toename van de actieve oppervlakte van deeltjes in suspensie gemeten door het nabijgelegen meetstation voor buitenlucht, maar niet met een toename in deeltjesgebonden polycyclische aromatische koolwaterstoffen. Monitoring van de actieve oppervlakte ("active surface") van partikels met een diameter van 10nm tot 1 micrometer middels een "diffusion charging sensor" kan bijkomende informatie opleveren bij de bewaking van stofdeeltjes voor de preventie van acute effecten op het ademhalingsstelsel (Moshhammer & Neuberger, 2003)

2.6 Respiratoire pathologie

Dat luchtpollutie leidt tot het verergeren van respiratoire pathologie wordt gesuggereerd door volgende waarnemingen:

De effecten van langdurige blootstelling aan luchtpollutie op ademhalings symptomen en hospitalisatie voor ademhalingsaandoeningen (voor astma, bronchitis of pneumonie) werden nagegaan in een cross-sectionele studie op kinderen (leeftijd 7--11 jaar, N=667) wonend in een middelmatig geïndustrialiseerde stad in centraal Slovaakse Republiek. Logistische regressie wees op een significante toename in hospitalisaties voor astma, bronchitis of pneumonie geassocieerd met toenemende luchtpollutie (OR 2.16, CI, 1.01--4.60). Door een arts gediagnosticeerde bronchitis (OR 1.53, CI, 1.02-2.30), en door ouders gerapporteerde chronische "phlegm" (OR 3.43, CI, 1.64--7.16) vertoonden een stijging, uitgedrukt als relatieve kans ("odds") voor een toename van 15 µg/m³ in geschat Totaal Gesuspendeerd Stof (Total Suspended Particles, TSP), en deze stijgingen zijn niet te wijten aan verschillen in socio-economische, gezondheidszorg of andere geïdentificeerde factoren (Hrubá et al., 2001).

2.7 Maatregelen tegen luchtpollutie werken remediërend.

Dat maatregelen tegen luchtpollutie de longfunctie kunnen verbeteren en de incidentie van respiratoire infecties kunnen verminderen wordt gesuggereerd door volgende waarnemingen:

- Avol et al. (2001) bestudeerden 110 kinderen (59 jongens en 51 meisjes die 10 jaar oud waren bij de start van de studie en 15 jaar oud bij de opvolging) die verhuisd waren uit gemeenten die deelnamen aan een 10-jaar prospectieve studie aangaande respiratoire gezondheid. Als groep vertoonden subjecten die verhuisd waren naar gebieden met lagere PM₁₀ concentraties toegenomen groei in longfunctie en subjecten die verhuisd waren naar gemeenten met hogere PM₁₀ concentraties verminderde groei in longfunctie (Avol et al., 2001).
- Recente studies vonden een daling in de prevalentie van respiratoire infecties in Oost-Duitse kinderen, aansluitend op een grote daling van de luchtvervuiling sedert 1990. Frye et al. (2003) evalueerden de effecten van een verbetering in de luchtkwaliteit op de longfunctie. Drie opeenvolgende cross-sectionele studies op schoolkinderen (11 tot 14 jaar oud) uit drie gemeenten in Oost-Duitsland werden uitgevoerd in 1992-1993, 1995-1996, and 1998-1999. Longfunctie tests op 2,493 waren beschikbaar. Het jaarlijkse gemiddelde voor Totaal Gesuspendeerd Stof "total suspended particulates" (TSP) nam af van 79 tot 25 µg/m³, terwijl zwaveldioxide gehaltes afnamen van 113 tot 6 µg/m³. Gemiddelde geforceerde vitale capaciteit ("Mean forced vital capacity" (FVC)) en geforceerd expiratoir volume in 1 seconde (forced expiratory volume in 1sec (FEV(1))) van de kinderen steeg van 1992-1993 tot 1998-1999. Het gecorrigeerd percentage verschil van het geometrisch gemiddelde van FVC was 4.7% voor een 50 µg/m³ afname in TSP (p = 0.043) en 4.9% voor een afname van 100 µg/m³ SO₂ (p = 0.029). Effecten op FEV(1) waren kleiner en niet statistisch relevant. Deze studie toont aan dat een vermindering in de vervuiling van de lucht reeds na korte tijd kan leiden tot een verbetering in de longfunctie van kinderen (Frye et al., 2003).
- Vorig onderzoek aangaande de effecten van luchtpollutie heeft associaties gevonden met chronische nadelige gezondheidseffecten zelfs bij de relatief lage concentraties aan stofdeeltjes die heden ten dage gemeten worden in de meeste stadsgebieden. Heinrich et al. (2002) onderzochten de impact van verminderingen in Totaal Gesuspendeerd Stof

(TSP) en in zwaveldioxide in Oost Duitsland na de réunificatie op de prevalentie van niet-allergische respiratoire aandoeningen bij kinderen. In de negentiger jaren namen TSP(massa aan gesuspendeerde partikels) en zwaveldioxide af, terwijl het aantal partikels (partikelkernen, "nucleation-mode particles", 10 tot 30 nm in diameter) toenam. In drie studiegebieden werden vragenlijsten m.b.t. 7,632 kinderen van 5 tot 14 jaar oud verzameld in drie fasen: 1992-1993, 1995-1996, en 1998-1999. Gecorrigeerde relatieve kansen (Adjusted odds ratios (ORs)) en 95% confidentie intervallen (CIs) voor een toename met 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ in TSP waren 3.0 (CI = 1.7-5.3) voor bronchitis, 2.6 (CI = 1.0-6.6) voor sinusitis, en 1.9 (CI = 1.2-3.1) voor frequente verkoudheden. Het effect voor een toename met 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ in sulfur dioxide was gelijkaardig. De ingeschatte effecten voor TSP en zwaveldioxide waren sterker bij kinderen die niet blootgesteld waren aan gaskachelemisaties, zichtbare schimmels, vochtigheid, katten of environmentele tabaksrook. De afnemende prevalentie van niet-allergische respiratoire symptomen, samen met verbeteringen in de TSP massa en in zwaveldioxide (maar niet in aantal partikelkernen ("nucleation-mode particles")), wijst op de reversibiliteit van nadelige gezondheidseffecten bij kinderen. Dit brengt bijkomende evidentie aan voor een causale associatie tussen verbrandings-gerelateerde luchtpolluenten en respiratoire symptomen bij kinderen(Heinrich et al., 2002).

- Maatregelen om de luchtpollutie te verminderen kunnen tot een vermindering van de respiratoire en cardiovasculaire sterftcijfers leiden. In Dublinstad daalden de respiratoire en cardiovasculaire sterftcijfers ten gevolge van een verbod op de verkoop en distributie van kolen als brandstof dat werd ingevoerd in 1990 (Clancy et al., 2002)

2.8 Inductie van astma

Dat luchtpollutie toch ook bij de inductie van astma, en niet alleen bij de verergering van de symptomen ervan, een rol speelt wordt gesuggereerd door volgende waarnemingen:

- De incidentie van nieuw gediagnosticeerde astma is geassocieerd met zware lichamelijke inspanningen in gemeenten met hoge ozonconcentraties. Luchtpollutie en buitenhuisinspanningen zouden kunnen bijdragen tot het ontstaan van astma bij kinderen. In gemeenten met hoge ozonconcentraties bedraagt het relatief risico op astma bij kinderen die 3 of meer sporten beoefenen 3.3 (95% CI 1.9-5.8) vergeleken met kinderen die niet aan sport doen (McConnell et al., 2002).
- Over een periode van 4 jaar was de prevalentie van astma hoger bij meisjes die minder dan 50 meter van grote wegen woonden dan bij meisjes uit andere gebieden. Tests voor trends toonden dat de prevalentie van astma bij meisjes op significante wijze steeg met stijgende concentraties van luchtpolluenten in alle onderzochte streken. Onder jongens was de prevalentie van astma niet verschillend in relatie met de afstand tot wegen, alhoewel de prevalentie hoger was in stedelijke gebieden dan in landelijke gebieden. De incidentie van astma gedurende de follow-up periode steeg op significante wijze bij jongens die dicht bij grote wegen woonden in vergelijking met jongens uit landelijke streken. (odds ratio = 3.75; 95% confidentie interval: 1.00-14.06) (Shima et al., 2003).
- Binnenshuisblootstelling aan formaldehyde ($>$ or $=$ 60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) verhoogt het risico op astma op significante wijze bij jonge kinderen (Rumchev et al., 2002).

Dat luchtpollutie een rol speelt bij de inductie van astma, en dat maatregelen tegen luchtpollutie effect kunnen sorteren, wordt gesuggereerd door volgende waarnemingen:

- De alternatieve transportstrategie die tijdens de Olympische Zomerspelen van 1996 geïmplementeerd werd in Atlanta leverde de mogelijkheid op om de impact te bestuderen van een grondige wijziging in het transport op de luchtkwaliteit en op astma bij kinderen. Een ecologische studie vergeleek de 17 dagen van de Olympische spelen met een

basislijn periode bestaande uit de 4 weken voor en de 4 weken na de Olympische spelen. Dagelijkse piekconcentraties in ozon daalden met 27.9%, van 81.3 ppb gedurende de basislijn periode tot 58.6 ppb gedurende de Olympische spelen ($P < .001$). Piek weekdag ochtendlijke verkeerstellingen daalden met 22.5% ($P < .001$). Verkeerstellingen waren significant geassocieerd met de piek ozonconcentraties van dezelfde dag. (gemiddelde $r = 0.36$ voor alle 4 onderzochte wegen). Meteorologische condities gedurende de Olympische spelen waren niet substantieel verschillend van deze tijdens de basislijn periode. Gedurende de Olympische spelen daalde het aantal astma spoedgevallen met 41.6% (4.23 vs 2.47 gevallen per dag) in de Georgia Medicaid databank, 44.1% (1.36 vs 0.76 gevallen per dag) in de databank van een gezondheidsbehoud organisatie, 11.1% (4.77 vs 4.24 gevallen per dag) in 2 pediatrie spoedafdelingen, en 19.1% (2.04 vs 1.65 hospitalisaties per dag) in the Georgia Hospitaal Ontslag Database (Friedman et al., 2001).

2.9 Inductie van allergieën.

Dat luchtpollutie een rol speelt bij de inductie van allergieën, wordt gesuggereerd door volgende waarnemingen:

- Pollenkorrels die werden geïncubeerd in een proteïne vrije buffer bleken significante hoeveelheden eicosanoid-achtige substanties te secreteren, namelijk leukotriene (LT) B(4)-achtige en prostaglandin E(2)-achtige substanties. Daarenboven bleken pollen die werden verzameld nabij wegen met een hoge verkeersdichtheid significant grotere hoeveelheden van deze substanties te secreteren, wat erop wijst dat deze pollenkorrels een grotere pro-inflammatoire activiteit vertonen. Om het effect van luchtpolluenten te bestuderen werden niet-blootgestelde pollen in contact gebracht met verkeersgerelateerde polluenten zoals vluchtige organische stoffen (toluene, m-xyleen) op een dosis- en tijdsafhankelijke wijze in een "fluidized bed reactor". Terug werd een significante toename in de secretie van LTB(4)-achtige immunoreactiviteit vastgesteld, in contrast met blootstelling aan zwavel dioxide (Behrendt et al., 2001). Deze waarneming geeft ook een mogelijke verklaring van het feit dat allergieën meer frequent voorkwamen in West Duitsland dan in Oost Duitsland, waarneming die gezien werd als pleitende tegen een rol van luchtpollutie bij de inductie van allergieën. Wellicht was de hogere pollutie in Oost-Duitsland meer aan hogere SO_2 niveaus te wijten dan aan polluenten afkomstig van het verkeer.
- Lehman et al. (2001) konden aantonen dat blootstelling aan alkanen (C6, C9, C10) en aan aromatische verbindingen (tolueen, o-xyleen, m+p-xyleen, 2-,3-, en 4-ethyltolueen, chlorobenzeen) kan bijdragen tot het risico op allergische sensitatie voor de voedingsallergenen melk en eiwit (Odds ratio's tussen 5.7 en 11.2). Daarenboven werden significant verlaagde aantallen CD3+/CD8+ perifere T cellen gevonden in kinderen blootgesteld aan alkanen (C9-C13), naftaleen en chlorobenzeen. Blootstelling aan benzeen, ethylbenzeen en chlorobenzeen was geassocieerd met hogere percentages aan IL-4 producerende CD3+ T cellen. Zowel een toename in IL-4 producerende type 2 T cellen als een afname in IFN-gamma producerende type 1 T cellen kunnen bijdragen tot een type 2 gedomineerd geheugen in antwoord op allergenen. Daarom suggereerden zij dat allergische sensitatie in associatie met blootstelling aan VOCs gemedieerd wordt door een polarisatie van T cellen naar het type 2 fenotype toe (Lehman et al., 2001).

2.10 Effect op geboortegewicht.

Luchtpollutie leidt tot een vermindering van het geboortegewicht. Dit blijkt uit volgende waarnemingen:

- In een studiegroep die alle voldragen enkelvoudige levende geboortes in de periode 1995-1997 omvatte bij vrouwen die woonden binnen een afstand van ongeveer 2 kilometer van een luchtpollutie meetstation in Kaohsiung (Taiwan), bleek de afname in geboortegewicht 0,52 g te bedragen per 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ toename in zowel SO_2 als in PM10 tijdens de eerste trimester van de zwangerschap (Yang et al., 2003). Een blootstelling, tijdens het tweede trimester van de zwangerschap, aan een concentratie van kankerverwekkende polycyclische aromatische koolwaterstoffen in omgevingslucht van meer dan 25 ng/m^3 , aanwezig bij 2,3% van de onderzochte subjecten, was geassocieerd aan het voorkomen van intra-uteriene groeivertraging bij 20% van de betreffende baby's, overeenstemmend met een relatief risico van 3,89 (Frederica Perera, op het 34^o congres van de Environmental Mutagen Society, te Miami, 10-14 mei 2003).
- DNA adducten van polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAKs) in leukocyten en plasma cotinine werden gemeten in navelstrengbloed, respectievelijk als maat voor transplacentale blootstelling aan PAKs en tabaksrook. De studie subjecten waren 70 pasgeborenen uit de industriestad Krakow en 90 pasgeborenen uit Limanowa, een landelijke stad met veel meer verbruik van steenkool voor huishoudelijke verwarming. Pasgeborenen wiens peil van PAK-DNA adducten boven de mediaan ($3.85/10^8$ nucleotides) lag vertoonden bij de geboorte een significant verminderde lengte (min 1.1 cm), gewicht (minus 147g), en hoofdmtrek (min 0.9cm) na controle voor lichaamslengte, leeftijd, opleidingsniveau, alcoholconsumptie, en cotinineconcentratie van de moeder, voorkomen van laag geboortegewicht bij vorige zwangerschappen, zwangerschapsduur en geslacht van de pasgeborene (Perera et al., 1998).

2.11 Verhoogde sterfte van pasgeborenen.

Luchtpollutie leidt tot een stijging van de mortaliteit bij baby's. Dit blijkt uit volgende waarnemingen:

- Preliminare gegevens suggereren een associatie tussen mortaliteit bij baby's en verschillende luchtpollutieparameters, waaronder stofneerslag en polycyclische aromatische koolwaterstoffen (Jedrychowski et al., 2003).

2.12 Verminderde groei bij pre-adolescente kinderen.

Luchtpollutie leidt tot een vermindering van de groei bij pre-adolescente kinderen. Dit blijkt uit volgende waarnemingen:

- Jedrychowski et al. (2002) bestudeerden de impact van buiten- en binnenhuis luchtkwaliteit op de groeisnelheid van pre-adolescente kinderen na controle voor lichaamslengte van de ouders en mogelijke confounders. De gegevens waren afkomstig van een cohort prospectieve epidemiologische studie aangaande de effecten van luchtpollutie op ziekten van het ademhalingsstelsel bij 958 kinderen in Krakow. In het centrum van de stad (een sterk gepollueerde zone) bedroeg de gemiddelde waarde over een periode van 5 jaar voor het winterseizoen voor SMP (stofdeeltjes in suspensie) 103.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en voor SO_2 86.9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$; de overeenstemmende waarden voor het zomerseizoen bedroegen 32.3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en 41.8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. De snelheid van groei in lichaamslengte over een periode van 2 jaar was 1,5 cm lager in kinderen uit de sterk gepollueerde zone in vergelijking met kinderen uit de controle zone. Ongeveer 3,1% van de totale variabiliteit

in groeisnelheid gedurende de follow-up bleek, in een multivariaat model, verklaard te kunnen worden door de luchtpollutie op de plaats van woonst (Jedrychowski et al., 2002).

2.13 Lood in het bloed van kinderen.

De concentratie van lood in de lucht is een zeer belangrijke parameter m.b.t. bloedconcentraties van lood bij kinderen, relatief belangrijker dan gesteld in het US EPA Integrated Biokinetic Uptake Model for Lead (IEUBK), dat de nadruk legt op concentraties in de bodem. Dit blijkt uit de volgende gegevens:

- Sinds ongeveer 95 jaar is een lood-zink smelter in bedrijf in Trail, British Columbia. Sinds 1989 heeft de plaatselijke gemeenschap de bloedloodconcentratie gemeten bij kinderen, blootstellingswegen bestudeerd en veelomvattende opvoedkundig en "case management" programma's doorgevoerd. Van 1989 tot en met 1996 daalde de gemiddelde bloedloodconcentratie van kinderen onder de schoolgaande leeftijd met gemiddeld 0.6 µg/dl per jaar. Van 1996 tot 1999 daalden de gemiddelde bloedloodconcentraties met gemiddeld 1,8 µg/dl per jaar, van 11,5 in 1996 tot 5,9 in 1999. De meer recente snelle daling is grotendeels te wijten aan het opstarten van een nieuwe loodsmelter met moderne "flash-smelting" technologie in mei 1997. In 1998 was de rekenkundig jaargemiddelde loodconcentratie in lucht 0.28 µg/m³, vergeleken met 1.1 µg/m³ in 1996. Na de vermindering in smelter emissies werden reducties van ongeveer 50% waargenomen in lood belasting en concentraties in neerslag in de buitenlucht, in straatstof en in binnenhuisstof. Beperkte reducties (statistisch insignificant) werden waargenomen in tapijstof en bodem loodconcentraties. Gedurende de zomer van 2001 werden de smelter en zuiveringoperaties in Trail volledig opgeschort voor de duur van 3 maanden. Gedurende deze periode daalden de gemiddelde luchtconcentraties aan lood tot 0.03 µg/m³. De gemiddelde bloedloodspiegel in kinderen onder de schoolgaande leeftijd bij het einde van de sluitingsperiode bedroeg 4.7 µg/dl. Deze resultaten stellen de overheersende theorieën over het relatieve belang van verschillende environmentele bronnen van blootstelling aan lood in vraag. Zo bijvoorbeeld zou de "US EPA Integrated Biokinetic Uptake Model for Lead (IEUBK)", waarin zeer veel nadruk wordt gelegd op bodemconcentraties, de zeer sterke daling in de bloedloodspiegels van de kinderen volgend op de vermindering in de loodconcentraties in omgevingslucht, niet hebben voorspeld. De waarnemingen en ervaring opgedaan in Trail suggereren dat meer aandacht moet gaan naar het belang van actieve bronnen van duidelijk biobeschikbaar en beweeglijk loodhoudend stof (Hilts, 2003).

Bloedloodconcentraties, zelfs beneden de 10 µg/dl, zijn geassocieerd aan een afname van de intelligentie:

- Chronische blootstelling, vooral prenataal en op peuter- en kleuterleeftijd geven aanleiding tot een verlaagd IQ (Srianujata 1998). Deze effecten zijn partieel onomkeerbaar en worden consistent beschreven vanaf loodconcentraties in het bloed van 10 µg/dl en hoger (review Feldman 1999, Tong 1998a,b; Mendelsohn et al. 1999; Minder et al. 1998).
- Nochtans worden ook effecten bij lagere concentraties beschreven: In een studie op kinderen uit Rochester, New York, vonden Canfield et al., 2003 dat bloedloodconcentratie omgekeerd en significant geassocieerd was met een verminderd IQ in de eerste vijf jaren van het leven. In een niet-lineair model daalde het IQ met 7,4 punten voor een toename van de levenslange gemiddelde bloedloodconcentratie van 1 tot 10 µg/dl, en met 4,6 punten voor een toename van de levenslange gemiddelde bloedloodconcentratie van 10 tot 20 µg/dl. Per eenheid van inwendige blootstelling was het effect van lood op IQ marginaal groter bij lagere blootstellingsniveaus dan bij hogere blootstellingsniveaus.

2.14 Verhoogde concentraties van luchtpartikels in relatie tot sterfte.

Verhoogde concentraties van luchtpartikels zijn geassocieerd met een stijging in de onmiddellijke (dagelijkse) mortaliteit:

- De meta-analyse van het APHEA project schat de gemiddelde toename in dagelijkse sterfte in West-Europese steden op 0.6% (0.4%-0.8%) voor een toename van 10 µg/m³ PM10 (Katsouyanni et al., 2001). Data van de APHEA studie wijzen op een invloed van NO_x, en op een effectmodificatie die afhankelijk is van de ligging en het klimaat van de stad in kwestie, en van de veroudering en gemiddelde levensverwachting. Hierdoor wordt een groot deel van de regionale verschillen verklaard. In een uitgebreide en gezaghebbende studie van 90 grote steden in de VS, de "National Morbidity, Mortality and Air Pollution Study" (NMMAPS), bedraagt de associatie gemiddeld ongeveer 0.25% toename in sterfte de dag volgend op een toename van 10 µg/m³ PM10 (Samet et al., 2000). Sterfte neemt meer toe bij ouderen en mensen met cardio-respiratoire aandoeningen, dan bij jongeren of gezonde mensen. Zelfs PM_{0,1} blijkt een belangrijke bijdrage te leveren tot sterfte (Wichmann et al., 2000). Er wordt ook een verband gelegd met neonatale sterfte (Bobak et al., 1999). Alle parameters inzake verontreiniging met deeltjes buiten PM(2.5-10) vertoonden een significante associatie met de dagelijkse totale mortaliteit (betreffende alle doodsoorzaken) gedurende het warme seizoen in de West Midlands conurbatie (agglomeratie van steden) van het Verenigd Koninkrijk. De resultaten suggereren dat de actieve component van PM10 vooral in de fijne fractie schuilt en dat dit vooral te wijten is aan primaire partikels afkomstig van verbrandingsprocessen (vooral i.v.m. voertuigen), met een contributie van secundaire partikels. Effecten van de grove partikelfractie kunnen niet uitgesloten worden (Anderson et al., 2001).

2.15 Verminderde levensverwachting.

Luchtpollutie is geassocieerd met een afname van de levensverwachting:

- Globaal genomen wordt de verkorte levensverwachting door blootstelling aan normale (40 µg/m³) PM10 concentraties geschat op 1-2 jaar, wat in vergelijking met andere omgevingsfactoren zoals lifestyle een aanzienlijk effect is. Dockery et al. (1993) volgden in de "Six Cities study" een cohorte op van 8000 volwassenen in zes steden van de VS, met verschillende luchtkwaliteitsniveaus van 1974-1991. Pope et al. (1995, 2002) voerden een studie uit op een cohorte voor de American Cancer Society (ACS), vanaf 1980, waarbij ongeveer een half miljoen personen in 151 steden opgevolgd werden. Beide studies geven significante en belangrijke associaties tussen sterfte en blootstelling aan PM_{2,5}, sulfaten en PM10 aan, bij lage concentraties en concentratieverschillen. De resultaten van deze studie werden in een review bevestigd (Krewski et al., 2000).
- Rabl (2003) bestudeert de relatie tussen de resultaten van epidemiologische studies van mortaliteit te wijten aan luchtpollutie en impact indicatoren die informatie kunnen opleveren die relevant is voor beslissingen inzake milieubeleid. Gebruik makend van eenvoudige en transparante modellen, die de essentiële elementen omvatten, wordt aangetoond dat:
 - 1° het aantal overlijdens niet relevant is m.b.t. luchtpollutie, terwijl verlies van levensverwachting een belangrijke impact indicator is,
 - 2° de gebruikelijke korte termijn (tijd series) studies een verandering in het dagelijks aantal overlijdens te wijten aan acute effecten van luchtpollutie beschrijven, zonder enige informatie op te leveren over het geassocieerde verlies aan levensverwachting. (alhoewel recent een zekere mate van informatie dienaangaande beschikbaar kwam door het verbreden van het observatievenster van tijdsseries),

3° lange termijn studies veranderingen in leeftijdspecifieke mortaliteit opleveren, die het mogelijk maken het gemiddelde verlies aan levensverwachting te berekenen voor de totale populatie (acute en chronische effecten, maar niet het totaal aantal voortijdige overlijdens te wijten aan luchtpollutie. Dit laatste gegeven kan niet uitgeklaard worden omdat niet kan uitgemaakt worden of enkele individuen een groot verlies van levensverwachting lijden dan wel veel individuen een klein verlies aan levensverwachting. Het verlies aan levensverwachting tengevolge van blootstelling aan PM10 wordt berekend uitgaande van lange termijn mortaliteitstudies op volwassenen en kinderen; het verlies aan levensverwachting voor de hele populatie vloeit vooral voort uit dat van volwassenen. Het verlies aan levensverwachting dat geïmpliceerd wordt door korte termijn studies is slechts een kleine fractie van het totale verlies aan levensverwachting geïmpliceerd door lange termijn studies, zelfs als men een zeer hoog verlies per sterftegeval in rekening brengt. Met betrekking tot milieubeleid kan men berekenen dat een permanente vermindering van PM10 met 50 tot 70%, wat als een redelijke doelstelling kan beschouwd worden, leidt tot een toename van de gemiddelde levensverwachting met ongeveer 4 maand (Rabl, 2003).

- In een vervolg van de ACS studie worden de associaties van langdurige blootstelling aan PM_{2,5} met vervroegde sterfte bevestigd en verfijnd (Pope et al., 2002). In de nieuwe studie wordt uitgebreider rekening gehouden met verstoringsfactoren, en wordt een meer verfijnde statistiek en een dataset over 16 jaar gehanteerd. Op basis van de verschillen in blootstelling aan PM_{2,5} in verschillende steden komt men tot een verhoogd risico van 4% voor totale niet-accidentele sterfte, toe te schrijven aan een verhoging met 10 µg/m³ PM_{2,5}.

2.16 Verhoogde incidentie van diabetes.

Emissies in de lucht van het Seveso-type kunnen de incidentie van diabetes doen toenemen:

Een duidelijke toename in mortaliteit tengevolge van diabetes werd waargenomen na de Seveso-ramp (Pesatori et al., 1998), vooral bij vrouwen (RR = 2.4, 95% CI: 1.2, 4.6) (Bertazzi et al., 2001). Bij mannelijke arbeiders in de USA werd daarentegen een negatief verband geobserveerd tussen blootstelling aan dioxines en sterfte tengevolge van diabetes (Steenland et al., 1999).

2.17 Optreden van immunodepressie.

Luchtpollutie kan het optreden van immunodepressie in de hand werken:

Bij diabetische muizen werd een synergistische afname in humorale en cellulaire immuniteit vastgesteld na blootstelling aan gepollueerde lucht (Zambad et al., 1999).

2.18 Sterfte door cardiovasculaire aandoeningen.

Luchtpollutie kan de incidentie van en de sterfte aan cardiovasculaire aandoeningen doen toenemen:

Een Nederlandse cohorte studie waarbij volwassenen tussen 55 en 69 jaar gedurende 8 jaar werden opgevolgd bevestigd de relatie tussen langdurige blootstelling aan luchtverontreiniging en (cardiopulmonaire) sterfte en toonde ook aan dat het risico groter was voor personen die op minder dan 50 meter van een drukke weg wonen of op minder dan 100 meter van een snelweg (Hoek et al., 2002). In een vervolg van de ACS studie worden de associaties van langdurige blootstelling aan PM_{2,5} met vervroegde sterfte bevestigd en

verfijnd (Pope et al., 2002). In de nieuwe studie wordt uitgebreider rekening gehouden met verstoringsfactoren, en wordt een meer verfijnde statistiek en een dataset over 16 jaar gehanteerd. Op basis van de verschillen in blootstelling aan PM_{2,5} in verschillende steden komt men tot een verhoogd risico van 6% voor cardio-pulmonaire sterfte toe te schrijven aan een verhoging met 10 µg/m³ PM_{2,5}.

HOOFDSTUK 2

BEMONSTERING VOOR EFFECTGERICHTE METINGEN

Vincent Dufour

1 INLEIDING

De atmosfeer is een complex systeem bestaande uit gassen, water (aerosolen) en vaste deeltjes (partikels). Hierdoor is het bemonsteren van luchtpolluenten, zeker wanneer het componenten betreft die zowel in de gasfase als de partikel- gebonden fase voorkomen, een moeilijk gegeven. Immers het capteren van partikels zal het evenwicht in de gasfase beïnvloeden.

Het voorkomen van componenten in beide fasen stelt zich hoofdzakelijk bij de organische componenten en is gekend onder de term "semi-vluchtige". Deze classificatie wordt gedefinieerd op basis van hun dampspanning (England et al., 1998):

- Organische componenten (OC) met een dampspanning $> 10^{-1}$ mm Hg komen voor in de vluchtige fase en worden de "vluchtige" (VOCs) genoemd.
- Organische componenten met een dampspanning tussen de 10^{-1} mm Hg en de 10^{-7} mm Hg komen zowel in de gasfase als partikelgebonden fase en worden geklasseerd als de "semi-vluchtige" (SVOCs).
- De "niet-vluchtige", componenten met een dampspanning $< 10^{-7}$ mm Hg komen enkel in de partikelfase voor.

In praktijk is het onderscheid niet altijd zo eenvoudig, naast de dampspanning zijn er heel wat omgevingsfactoren (atmosferische temperatuur, partikel concentratie, vochtigheid, ...) die deze gas- partikel verdeling bepalen.

In een meer aangepaste definitie worden de Semi-Vluchtige OCs omschreven als de "Condenseerbare" fractie (Turpin et al., 2000). Hierbij verstaande de fractie die onder de range van condities voorkomend in dit grensgebied, zowel in de gasfase als de partikelgebonden fase kan bestaan.

2 STAALNAME ARTEFACTEN

Het evenwicht tussen de gas en de partikel- gebonden fase wordt bij staalname verstoord, de drang om dit evenwicht te herstellen vormt de voornaamste drijfveer voor uitwisseling tussen de verschillende fasen. Artefacten te wijten aan dit verstoord evenwicht kunnen op twee manieren veroorzaakt worden: namelijk door het vervluchtigen van de partikelgebonden OC (Blow off) en door adsorptie van OC uit de gasfase op de filter, en dit gedurende en/ of na de bemonstering. Schattingen voor artefacten variëren van -80% door vervluchtiging tot + 50% door adsorptie.

- Adsorptie: Wanneer de condenseerbare fractie de sample unit binnenkomt is deze in evenwicht met de gasfase. Wanneer echter de partikel- gebonden fractie op de filter geïncubated wordt zal het OC uit de gasfase gaan adsorberen om dit evenwicht te herstellen. Bepalende factoren hierbij zijn: de atmosferische temperatuur, het beschikbaar adsorptie oppervlak, de partitie- coëfficiënt (bv. dampspanning) en de aanwezigheid van andere concurrerende adsorbanten zoals waterdamp.

- Vervluchtiging van partikel- gebonden OC treedt op bij drukverval over de filter. De gasfase concentratie achter de filter zal dalen als de gasdruk daalt. Om de concentratie in de gasfase op peil te houden zullen OC vervluchtigen van de filter.

Andere artefacten treden op ten gevolge van veranderende atmosferische condities gedurende de staalname.

- Veranderende atmosferische concentraties van condenseerbare OC kan vervluchtiging of adsorptie veroorzaken.
- Veranderende concentraties aan andere (reactieve) gasvormige componenten kan de samenstelling van het gecollecteerde materiaal wijzigen door chemische reacties. Partikel- gebonden PAKs gecollecteerd op de filter kunnen omgezet worden tot geoxideerde en genitreeerde derivaten. Volgens Schauer et al. (2003) zouden deze filterreactie artefacten aanleiding kunnen geven tot een onderschatting van de actuele PAK concentraties met 100%.

3 BEMONSTERING

3.1 Basisprincipes

Men kan de bemonsteringsmethodes van de gas- en partikel fase onderverdelen in drie types:

1) Dynamische: hierbij wordt lucht aangezogen in de sample unit over het collecterende medium.

Vb. Hoog-volume bemonstering met filtercollectie

2) Passief: de te bemonsteren componenten komen via permeatie of diffusie in contact met het collecterend medium.

Vb. solid phase microextraction (SPME)

3) Afstrippen (methode die ontstaan is ter aanvulling van dynamische systemen): is een kracht die in de richting van de gasstroom gaat en loodrecht daarop een radiale diffusie kracht oplevert. Op die manier drijven de OC in de gasfase naar de collecterende zijwand terwijl partikels de gasstroom blijven volgen.

Vb. Cilindrische denuder

3.2 Staalname methodes

3.2.1 Dynamische methodes

Met behulp van een pomp wordt met een constant debiet lucht aangezogen in een sample unit. De stoffen worden voornamelijk gecollecteerd door filtratie, adsorptie en absorptie. Het is de meest courante methode en het laat toe om grote volumes te bemonsteren. Dit maakt dat er voldoende materiaal gecollecteerd kan worden om naast chemische analyses ook biologische tests uit te voeren. Hieronder een kort overzicht van de belangrijkste opstellingen en hun tekortkomingen (artefacten):

- Filter/adsorbens combinatie (FA): een filter met stroomafwaarts een adsorber is de eenvoudigste en meest courant toegepaste opstelling.
Artefacten: De filtermatrix heeft een groot contactoppervlak met de aangezogen luchtstroom waardoor componenten uit de gasfase gemakkelijk kunnen adsorberen aan het filteroppervlak. Omgekeerd kunnen de partikel- gebonden OC gecollecteerd op de

filter verdampen als de concentraties in de gasfase onder het evenwichtsniveau dalen. Tenslotte kunnen PAKs geïmponeerd op filter/adsorber chemisch transformeren door reactie met componenten uit de gasfase (O_3 en NO_x); ozon, hydroxyl- en nitraat radicalen zijn zeer reactieve agentia die PAKs kunnen transformeren en/ of degraderen. Zo is bv. Benzo[a]pyreen zeer gevoelig voor degradatie onder invloed van aanwezige ozon.

- Filter/ filter/ adsorbens combinatie: maakt gebruik van een tweede filter, achter de eerste filter en dit om te corrigeren voor de adsorptie van de gasfase componenten aan de eerste filter.
Artefacten: Idem FA combinatie. Correctie voor adsorptie artefacten enkel geldig wanneer beide filters gelijkaardige hoeveelheden OC uit de gasfase adsorberen (evenwicht bereikt hebben) en dat vervluchtiging van partikel- gebonden organisch materiaal onbestaande is.
- Denuder/ filter/ adsorbens combinatie: De gasfase wordt geïmponeerd stroomopwaarts in de denuder, de partikel- gebonden OC stroomafwaarts op de filter en het adsorbens. De denuder verwijdert de gasfase OC doormiddel van diffusie naar het adsorberend oppervlak, de partikels worden stroomafwaarts op de filter en de back-up adsorbens geïmponeerd.
Artefacten : Het strippen van de gasfase voor de filter verstoort het gaspartikel evenwicht. Hierdoor zal het verlies door vervluchtiging op de filter groter zijn wanneer deze stroomafwaarts staat van denuder, dan zonder denuder. (Turpin et al 2000.). Om dit te corrigeren wordt gebruik gemaakt van een back-up adsorbens na de filter. Specifieke denuder artefacten, zie paragraaf 3.2.3
- Impactor/ adsorbens combinatie: Inertie impactors scheiden partikels in massafracties op basis van hun afmeting. Cascade impactors (inertie impactors in serie) kunnen de distributie van de partikelgrootte meten alsook de condenseerbare fractie collecteren. Achter de impactor wordt een adsorbens geplaatst om de gasfase componenten te collecteren.
Artefacten: Idem als FA combinatie. Het hoge drukverval, vereist om partikels te scheiden naar grootte, veroorzaakt vervluchtiging van de partikel- gebonden OC. Om partikels efficiënt te collecteren worden de impactors soms ingevet, dit kan adsorptie uit de gasfase versterken.

Voor de collectie van partikels op filters zijn er drie types die courant gebruikt worden:

- Quartz fiber filters: groot specifiek oppervlak, gevaar voor adsorptie gasfase.
- Teflon membraanfilters (PTFE): kleiner specifiek oppervlak, niet bestand tegen hoge temperaturen voor bv. thermische koolstof analyse.
- Teflon coated quartz fiber filters: hogere affiniteit voor polaire componenten

Voor het capteren van de gasfase OC zijn de belangrijkste adsorbens: XAD-2[®] hars en polyurethaan foam (PUF). XAD heeft een hogere collectie en retentie-efficiëntie voor de vluchtigste PAKs, maar PUF zijn handelbaarder in het veld en hebben betere luchtstroomkarakteristieken tijdens staalname.

Om mogelijke degradatie of transformatie van het geïmponeerde materiaal tegen te gaan worden de bemonsterde filters het best zo snel mogelijk afgeschermd van licht (UV) en lucht (reactieve gassen, zoals ozon, NO_x). Om vervluchtiging te beperken is het eveneens belangrijk de filters koel te transporteren en te bewaren. En dit zo snel mogelijk nadat de bemonstering is beëindigd. Een filter nog een halve dag in een sample unit laten zitten is niet bevorderlijk voor de stabiliteit van het staal.

3.2.2 Passieve methodes

Passieve methoden worden hoofdzakelijk toegepast voor analytische doeleinden en zijn minder geschikt voor effectmetingen. Passieve samplers zijn meestal ontwikkeld in functie van chromatografische technieken zoals GC of HPLC. De hoeveelheden aan toxicanten die hierbij bemonsterd worden zijn onvoldoende voor het gebruik in effectgerichte metingen.

3.2.3 Afstrippen

Het afstrippen met een denuder wordt toegepast in combinatie met dynamische bemonstering (zie 3.2.1) en bestaat in verschillende configuraties.

Of een denuder efficiënt kan functioneren hangt van verschillende voorwaarden af:

- stabiele en laminaire gasstroom
- opereren onder steady-state condities van druk en temperatuur
- gasstroom met uniforme temperatuur en viscositeit distributie
- sorptiemateriaal geschikt voor het te collecteren materiaal.

De denuder zelf bestaat in verschillende vormen: cilindrisch, ringvormig, plaatvormig, druppelvormig. Afhankelijk van de te bemonsteren componenten zijn er drie verschillende collectiemechanismen mogelijk: adsorptie op een vaste drager, chemisorptie op de wand van de denuder en absorptie in solvent. Voor de te bemonsteren organische componenten (zoals voornamelijk PAKs) wordt hoofdzakelijk met adsorptie op een vaste drager gewerkt. Mogelijke dragers hierbij zijn: actieve koolstof, XAD-2, XAD-4, Tenax, methylsilicone, nylon.

De belangrijkste artefacten bij een denuder zijn doorbraak van de gasfase en afzetting van partikels.

- Doorbraak van de gasfase doet zich voor wanneer de denuder de condenseerbare OC niet voor 100% uit de gasfase haalt.
- Afzetting van partikelgebonden condenseerbare OC in de denuder door inertie verlies (impact), afhankelijk van de gassnelheid en voornamelijk een probleem bij grotere partikels ($d_p > 1 \mu\text{m}$).
- Afzetting van partikelgebonden condenseerbare OC in de denuder door diffusie van voornamelijk kleinere partikels ($d_p < 0.01 \mu\text{m}$) en is afhankelijk van de verblijftijd.
- Vervluchtiging van de meest vluchtige partikelgebonden condenseerbare OC, met een voldoende hoge massa transfercoëfficiënt (verwijderen van de gasfase verstoort het gas- partikel evenwicht).

Om een denuder optimaal te kunnen gebruiken dient een balans gevonden te worden tussen een minimaal partikelverlies en verblijftijd en een maximale gasfase collectie efficiëntie. Dit vergt een intensieve optimalisatie en calibratie.

3.3 Bemonstering in functie van rechtstreekse blootstelling in testsysteem.

De hierboven methodes resulteren voornamelijk in bemonsterde filters en absorbens die vervolgens via (organische) extractie procedures worden voorbereid op de biologische metingen. In sommige tests (voor b.v. immunotoxiciteit), worden de biologische systemen niet blootgesteld aan organische extracten maar wel aan de partikels zelf. Deze methodes zijn er dus op gericht partikels te collecteren (dynamisch of passief) om zonder specifieke staalvoorbereiding te kunnen blootstellen in biologisch testsytemen. Hieronder volgt een kort overzicht.

3.3.1 Dynamische methodes

- Centrifugale partikel concentrator (Gordon et al, 1999): Deze methode wordt voornamelijk gebruikt in toxicologische inhalatiestudies. Omgevingslucht wordt aangezogen met behulp van een hoogvolume pomp en in een Greber centrifugale concentrator 10x geconcentreerd. De geconcentreerde luchtpartikels worden vervolgens een blootstellingskamer binnengeleid.
- Een andere onrechtstreekse methode maakt gebruik van ultrasonificatie (zie ook paragraaf 4). Partikels geïncubeerd op filters of op impactor substraten (zie ook 3.2.1) worden verwijderd en in een steriel medium (H₂O) gebracht door middel van een ultrasonificatie.

3.3.2 Passieve methodes

Collectie van partikels door depositie op opvangschalen.

4 EXTRACTIE PROCEDURES

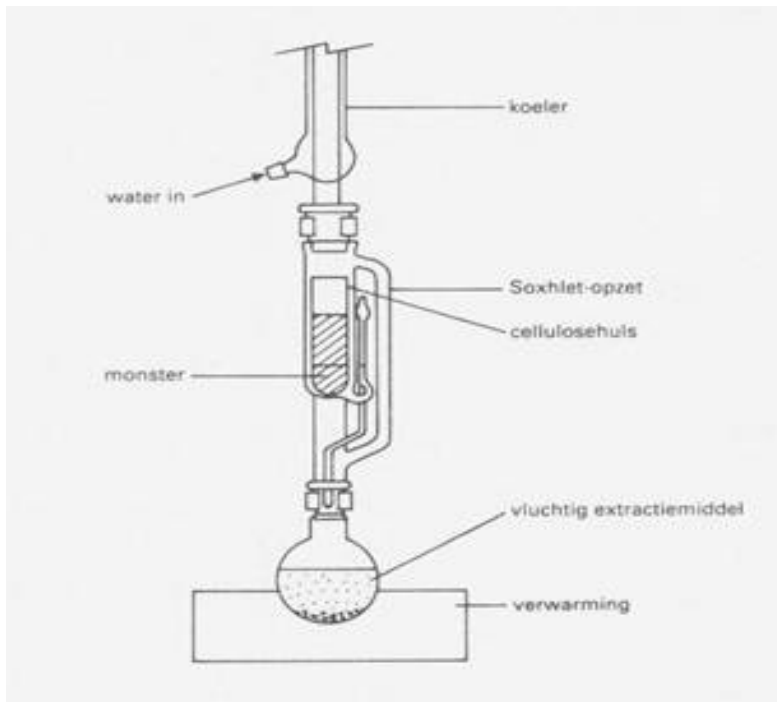
4.1 Organische extractie

4.1.1 Inleiding

Organische (solvent) extractie is het meest toegepaste principe voor het scheiden van water-onoplosbare of beperkt water-oplosbare componenten van hun matrix (partikels, grond,...). De extractie verloopt door het staal in contact te brengen met een solvent, de extractie efficiëntie wordt meestal verhoogd door het solvent te verwarmen of door ultrasone behandeling. Geen enkel solvent is universeel geschikt voor extractie van alle types van componenten. De selectiviteit van het solvent wordt bepaald door zijn polariteit. Vaak worden verschillende solventen gemengd of achter elkaar gebruikt met toenemende polariteit. Courante solventen zijn: ethanol, methanol, hexaan, aceton, diethylether, dichloormethaan(DCM), chloroform. Omdat deze solventen vaak toxisch zijn voor de biologische testsystemen wordt het extract nadien heropgelost in een niet of minder schadelijk oplosmiddel zoals dimethylsulfoxide (DMSO). Hierna volgt een overzicht van de belangrijkste solvent extractie technieken.

4.1.2 Soxhlet extractie (EPA method 3540C)

De soxhlet extractie is de meest verspreide methode. De opstelling (zie figuur 1) bestaat uit een kolf gevuld met solvent, daarop de Soxhlet extractor met een koeler. Het staal bevindt zich in de extractor in een extractie huls (cellulose huls) boven het solvent. Door verwarming van de onderste kolf verdampt het oplosmiddel dat omhoog stijgt in de buis, bij de koeler wordt het afgekoeld zodat het als vloeistof naar beneden stroomt in de extractiehuls (refluxen). Het niveau in de huls stijgt totdat het vloeistofniveau zo hoog is dat deze via een overloopbuisje in één keer volledig wordt overgeheveld. Dit oplosmiddel met extract verzamelt zich onder in de kolf. Hierna begint het proces van vollopen van de cellulosehuls weer van voren af aan. Dit proces wordt pas stopgezet indien vrijwel alle te extraheren stof onder in de kolf terecht is gekomen.



Figuur 1: Opstelling Soxhlet extractie

4.1.3 Automatische Soxhlet extractie (EPA Method 3541)

De automatische Soxhlet extractie verloopt in drie stappen. In de eerste stap wordt al het oplosmiddel in contact gebracht met het te extraheren monster (extractiehuls ondergedompeld in kolf met solvent), het solvent verwarmt, verdampt,...Dit refluxen wordt voortgezet tot het overgrote deel van de te extraheren stof in oplossing is. In de tweede stap wordt het staal opnieuw in contact gebracht met zuiver solvent, hiertoe wordt de huls uit de oplossing gehaald en komt het alleen in contact met de gecondenseerde damp van het solvent (= 1^e stap klassieke soxhlet). Tijdens de 3e stap (concentratie stap) laat men het oplosmiddel dat is verdampt niet terugvloeien. Het ingedampte extract bevindt zich nu in het onderste gedeelte van de opstelling. Deze automatische soxhlet bereikt dezelfde extractie efficiëntie als klassieke soxhlet maar sneller.

4.1.4 Accelerated Solvent Extraction (EPA Method 3545)

ASE gebruikt conventionele solvents bij verhoogde temperatuur (100-180°C) en druk (1500-2000 psi). De hogere temperatuur versnelt de extractie kinetiek, terwijl de hoge druk ervoor zorgt dat het solvent onder zijn kookpunt blijft. ASE bereikt dezelfde efficiëntie als de klassieke Soxhlet extractie maar met minder solvent en op veel kortere tijd.

4.1.5 Ultrasonic extraction (EPA method 3550B)

Het ultrasone proces zorgt voor een intens contact tussen het solvent en de staalmatrix. Het is geschikt voor de extractie van niet-vluchtige en semi-vluchtige organische componenten. Twee mogelijke opstellingen zijn een ultrasone sonde en een ultrasoonbad.

4.1.6 Microwave extraction (EPA method 3546)

Dit is een vrij eenvoudige opstelling waarbij het staal en solvent samen in een gesloten vat gaan. Het vat wordt in een microgolftoestel geplaatst, de energie van de microgolven zorgt voor hoge temperatuur (100-115°C) en drukcondities (50-175 psi). Sneller en minder solvent gebruik dan bij de klassieke Soxhlet zijn de belangrijkste pluspunten

4.2 Supercritical fluid Extraction (EPA method 356X)

Extractie met superkritische vloeistof is een recente ontwikkeling die niet gebaseerd is op de klassieke solventen maar met superkritisch CO₂ werkt. Onder atmosferische condities is CO₂ gasvormig maar onder hoge druk (73 atm) en bij een temperatuur van 31°C bevindt het zich in een toestand waarbij er geen onderscheid meer is tussen gas en vloeistof, 'superkritisch' genaamd. Superkritische stoffen combineren de eigenschappen van zowel gas als vloeistof. Superkritisch CO₂ gedraagt zich - in hoge druk vaten - als een ideaal oplosmiddel. Het heeft hetzelfde oplosend vermogen als organische solventen maar met betere diffusiteit en een lagere viscositeit en oppervlaktespanning. Het oplosend vermogen kan aangepast worden voor een specifiek doel door veranderingen in druk en temperatuur. Door toevoegen van b.v. methanol (1-10%) kan ook de polariteit van het superkritische CO₂ verhoogd worden.

De US-EPA heeft drie methodes met superkritische vloeistof specifiek afgestemd voor de extractie van Totale Petroleum KWS (EPA3560), PAKS (EPA3561) en Polygechloreerde Biphenylen/ Organochloor pesticiden (EPA3562).

Een superkritische vloeistof extractor bestaat uit een tank met een mobiele fase (CO₂), een pomp voor de gasdruk, een oven met het extractie vat, een drukregelaar en een opvangvat. Het extract wordt gecollecteerd door de superkritische vloeistof te laten decompresseren in het opvangvat.

5 INTERNATIONALE STANDAARDMETHODES

De belangrijkste methodes voor het bemonsteren voor de gas- en partikelfase in omgevingslucht zijn:

- EPA-method TO-13A: "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in ambient using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)". US EPA, Cincinnati 1999.
- EPA-method: "Integrated sampling of suspended particulate matter (SPM) in ambient air." US EPA, Cincinnati 1999.
- ISO 12884: "Air Quality-Determination of Gas and Particle-Phase Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in ambient air- Collection on sorbent-backed filters with gas chromatographic/ mass spectrometric analysis" 1999.
- EPA-Method SW-846: "Test methods for evaluating Solid Wastes, Physical/ Chemical methods. 3000 series" US EPA, Cincinnati 2002

HOOFDSTUK 3

OVERZICHT VAN TESTS

SYSTEMISCHE TOXICITEIT

E. Brits

GENOTOXICITEIT

N. Van Larebeke, V. Dufour, E. Brits & L. Verschaeve

HEMATOXICITEIT

IMMUNO- RESPIRATOIRE TOXICITEIT

R. Van Den Heuvel

REPRODUCTIETOXICITEIT

ENDOCRIENE TOXICITEIT

H. Witters

1 INLEIDING

Hoewel blootstelling aan luchtpollutie een gekend risico inhoudt voor de humane gezondheid, blijven onzekerheden en leemtes in kennis bestaan. Toxicologie draagt ertoe bij om biologische processen en de invloed van polluenten op de humane gezondheid te begrijpen. Dergelijke informatie kan de predictie en preventie van milieu- en gezondheidsproblemen ondersteunen. Toxicologische experimenten kunnen onderverdeeld worden in “*in vivo*” en “*in vitro*” experimenten. *In vivo* experimenten bestuderen effecten in levende organismen (mens en andere organismen); *in vitro* experimenten worden uitgevoerd op organen, weefsel of cellen geïsoleerd uit levende organismen, gisten en prokaryoten.

In deze studie worden testsystemen voor screeningsdoeleinden besproken, m.a.w. enkel *in vitro* tests. Testsystemen die eerder geschikt zijn voor fundamenteel mechanistisch onderzoek van luchtpolluenten worden niet of slechts in de marge besproken.

Effecten van luchtpolluenten kunnen bestudeerd worden in bacteriën, gisten, diverse cellijnen of primaire cellen. Indien mogelijk wordt steeds geopteerd om als model-teststelsysteem te kiezen voor een targetceltype van luchtpolluenten *in vivo*: zijnde cellen van diverse anatomische structuren van het (humane) respiratoir systeem.

In onderstaande tabel 6 worden eindpunten en targetsystemen weergegeven die belangrijk zijn voor toxicologische karakterisatie van stoffen (ECVAM). Deze tabel is niet specifiek opgesteld voor toxicologie van luchtpolluenten, vandaar dat er in aparte kolommen aangeduid wordt wat belangrijk is voor deze problematiek en meer specifiek wat haalbaar is voor screeningsdoeleinden zoals beoogd in dit project.

Benadrukt moet worden dat blootstelling aan luchtpolluenten door inhalatie complexe fysiologische en pathologische reacties in het respiratoir systeem en elders in het lichaam tot gevolg heeft. *In vitro* studies op zich zullen onvoldoende zijn om gezondheidsrisico's van luchtvervuiling volledig te duiden.

Tabel 6: Indeling van eindpunten voor toxiciteit en targetsystemen, aangepast op basis van tabel van ECVAM (Hartung et al., 2003).

ECVAM-indeling		Weerhouden in dit project voor testselectie screening	Bespreking Zie sectie
Systemische toxiciteit	Acute toxiciteit	x	Systemische toxiciteit: 2.1.
	Chronische toxiciteit	Neen, geen screeningstests	Systemische toxiciteit: 2.2.
	Neurotoxiciteit	Neen, geen gevalideerde screeningstests	Systemische toxiciteit: 2.4
	Haematotoxiciteit	Neen, minder relevant	Haematotoxiciteit: 4.
	Longtoxiciteit	x	Immuun-respiratoire toxiciteit: 5.
	Immuuntoxiciteit	x	
	Nefrotoxiciteit	Neen, niet relevant	Systemische toxiciteit: 2.3
	Cardiovasculaire toxiciteit	Neen, geen screeningstests	Systemische toxiciteit: 2.5.
	Hepatotoxiciteit	Neen, niet tot weinig relevant	Systemische toxiciteit: 2.7.
Plaatselijk werkende toxiciteit (topicaal)	Phototoxiciteit	Neen, niet tot weinig relevant	Immunotoxiciteit:5
	Huid corrosie		
	Huid irritatie		
	Oog irritatie		
Sensitisatie	Huid sensitisatie	x	Immuun-respiratoire toxiciteit: 5
	Respiratoire sensitisatie		
Carcinogeniteit	Genotoxiciteit	x	Genotoxiciteit: 4
Reproductie-toxiciteit	Ontwikkeling- en embryotoxiciteit	Neen, geen gevalideerde screeningstests die relevant zijn	Reproductie-toxiciteit: 6
	Hormoonverstoring	x	Endocriene toxiciteit: 7

2 SYSTEMISCHE TOXICITEIT

Stoffen die in de bloedbaan terecht komen, kunnen systemische toxiciteit veroorzaken. In hoofdstuk 1 werd aangegeven dat luchtvervuiling geassocieerd kan worden met ziektes zoals kanker, nierziekten, geslachtsziekten, congenitale afwijkingen, neurotoxiciteit, effecten op puberteit, endometriose, schildklierafwijkingen en cardiovasculaire aandoeningen. De effecten kunnen te wijten zijn aan specifieke werkingsmechanismen van de stoffen ter hoogte van het doelwitorgaan vb via binding aan receptoren, of ze kunnen te wijten zijn aan algemene cytotoxiciteit. Hierbij bedoelen we dat stoffen interfereren met basale celprocessen zoals beschadiging van de celmembraan, inhibitie van eiwitsynthese, celdeling, werking van celorganellen etc... Dit laatste wordt geëvalueerd via acute toxiciteitstests. De meeste stoffen zijn acuut toxisch bij hogere concentraties. Chronische effecten of specifieke toxische effecten worden meestal waargenomen bij lagere concentraties die geen algemene toxiciteit meer veroorzaken.

2.1 Acute toxiciteit

Om de toxiciteit van chemische stoffen of milieumatrices na te gaan wordt nog frequent gebruik gemaakt van *in vivo* experimenten. Deze proeven zijn arbeidsintensief en duur, wat ze minder geschikt maakt voor routinematige effectgerichte metingen van luchtkwaliteit.

Voor de evaluatie van acute toxiciteit kan echter ook gebruikt gemaakt worden van alternatieven op de *in vivo* tests, nl. *in vitro* systemen die door blootstelling van cellijnen, bacteriën of gisten celsterfte of daling van het celmetabolisme meten.

Verschillende tests komen hiervoor in aanmerking. Idealiter worden de tests uitgevoerd met longcellen, aangezien deze target zijn na inhalatie van partikels. Echter, andere cellijnen kunnen als model voor de cytotoxiciteit gebruikt worden.

Een greep uit het zeer uitgebreide gamma aan cytotoxiciteitstests wordt hieronder beschreven. De lijst is gebaseerd op de database van ECVAM.

Er wordt gekozen voor tests die parallel uitgevoerd kunnen worden met andere toxiciteitstests. Om uitspraak te doen over eindpunten als geno- en immunotoxiciteit, mag een pollutant enkel getest worden aan concentraties die niet cytotoxisch zijn. Het is dus niet zinvol een cytotoxiciteitstest uit te voeren met behulp van zeer specifieke cellen/organismen.

2.1.1 Cytotoxiciteitstest voor membraanschade

Het plasmembraan is het eerste contactpunt tussen cellen en xenobiotica. Beschadigingen en bijgevolg verandering in permeabiliteit is een indicator van schade, waarbij de grootte van intracellulaire componenten die lekken naar buiten uit de cel een maat is voor de schade. Pre-incubatie van cellen met [³H] adenine resulteert in incorporatie van de tracer in de ATP pool adenine fosforibosyltransferase en uiteindelijk in RNA en DNA. Radioactiviteit wordt gedistribueerd tussen de nucleotide pool en de macromoleculaire nucleïnezuren.

Cellen worden gepreïncubeerd met radioactief [³H] adenine en blootgesteld aan de teststof. Vervolgens wordt de distributie van de radioactiviteit bepaald in medium, in de intracellulaire nucleotide pool en in de intracellulaire macromoleculen. De distributie van de merker tussen de fracties in een test en controlecultuur wordt vergeleken om een inschatting te maken van de graad van membraanschade.

2.1.2 MTT assay

MTT assay tetrazolium zout, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), wordt opgenomen in cellen en gereduceerd door een mitochondriaal dehydrogenase enzyme. Hierbij wordt een paars formazan product gegenereerd waarvoor celmembranen niet doorlaatbaar zijn, met accumulatie in gezonde cellen tot gevolg. Solubilisatie van de cellen resulteert in de vrijstelling van het product, hetgeen detecteerbaar is adhv colorimetrie. De mogelijkheid van cellen om MTT te reduceren is een indicatie voor de mitochondriale integriteit en activiteit van overlevende cellen in een toxiciteitstest.

2.1.3 De Alamar Blue test

De AlamarBlue™ assay is een test om de metabole activiteit te meten van humane en dierlijke cellijnen. De assay kan ook toegepast worden op fungi en bacteriën. De assay kan gebruikt worden om de relatieve cytotoxiciteit van verschillende chemische agentia te bepalen. Wanneer de cellen blootgesteld worden aan cytotoxische agentia, zal de metabole activiteit van deze cellen veranderen (deze kan zowel verminderen als gestimuleerd worden) en deze verandering kan gemeten worden met de AlamarBlue™ assay. De procedure verloopt telkens op dezelfde manier, enkel de incubatietijd met AlamarBlue™ kan verschillen naargelang de cellijn.

De AlamarBlue™ assay bestaat uit een fluorometrische/colorimetrische indicator die gebaseerd is op de detectie van metabole activiteit. Het gaat om een redox-indicator die zowel van kleur verandert als fluorescentie vertoont in respons op chemische reductie van het celgroeimeidium, wat wijst op celgroei. De indicator zelf is niet toxisch voor de cellen en niet carcinogeen. Data kunnen verzameld worden dmv fluorescentiemeting . Fluorescentie wordt gemeten bij 530 nm excitatie golflengte en 590 nm emissie golflengte.

2.1.4 De neutraal rood cytotoxiciteitstest

De basis van deze cytotoxiciteitstest is dat een chemische stof interfereert met de celgroei op een dosisafhankelijke manier, hetgeen resulteert in een vermindering van celgroei en dus ook van celaantal. Neutraal rood (NR) wordt gebruikt om het aantal levende cellen te bepalen. NR is een zwak kationische kleurstof, die in de cel diffundeert en in intacte lysosomen bindt aan negatief geladen bindingsplaatsen. Beschadiging van de lysosomen door de teststof resulteert in een verminderde NR opname en binding.

De test kan toegepast worden op verschillende cellijnen, de procedure is telkens dezelfde. Data kunnen verzameld worden dmv colorimetrie. Absorbantie wordt gemeten bij 530 nm.

2.2 Chronische toxiciteit

Hoewel chronische toxiciteit uiteraard belangrijk is bij de beschouwing van het gezondheidsrisico van luchtpollutie, wordt deze topic niet besproken in deze studie. Geen screeningstests zijn voorhanden om chronische toxiciteit te bestuderen, hiervoor zijn proefdiermodellen noodzakelijk.

2.3 Nefrotoxiciteit

Verscheidene stoffen die voorkomen in de buitenlucht kunnen een impact hebben op de renale functies. Kwik, lood en cadmium kunnen toxisch zijn voor de nieren na acute hoge dosis of chronische lage doses blootstelling. Verder kan acute en chronische nefrotoxiciteit het gevolg zijn van blootstelling aan gehalogeneerde koolwaterstoffen, organische solventen en pesticiden. Bij blootstelling aan omgevingsconcentraties in Vlaanderen van genoemde polluenten, is nefrotoxiciteit een eindpunt wat minder relevant is om te bestuderen. Hogere doses zijn vereist om acute nefrotoxiciteit te veroorzaken. Chronische toxiciteit is niet per se uitgesloten, maar *in vitro* modellen zijn niet geschikt om chronische blootstelling te evalueren.

2.4 Neurotoxiciteit

Neurotoxicologie bestudeert de nadelige effecten van agentia op het zenuwstelsel.

Het zenuwstelsel bestaat uit het centraal zenuwstelsel: hersenen en ruggenmerg, en het perifeer zenuwstelsel: zenuwvezels en ganglia (ophopingen van zenuwcellen) en tenslotte de cellen van neuronen in centraal zenuwstelsel en in perifere ganglia. Functies van het zenuwstelsel zijn waarnemen, verwerken en verspreiden van informatie, en organiseren en coördineren van lichaamsfuncties.

Cellen van het zenuwstelsel zijn:

- neuronen (zenuwcellen)
 - dendrieten: opvangen van prikkel
 - cellichaam (perikaryon): sterk eiwit synthetiserende cellen veel RER (Nissl substantie); cellen in CZS en in perifere ganglia
 - axon: doorgeven van prikkel naar synaps; neurofilamenten (steun) en neurotubuli (transport)
- typen neuronen
 - multipolair neuron: meer dan twee axonen en dendrieten
 - bipolair neuron: een axon en een dendriet
 - pseudo-unipolair neuron: een uitloper met "T-splitsing"
- begeleidende cellen: neuroglia
 - astrocyten: steun-, voeding- en herstelfunctie
 - oligodendrocyten: functie bij prikkelgeleiding
 - ependymcellen: bekleding holten van CZS
 - microglia: macrofagen, *niet* afkomstig van neurale buis maar van beenmerg

Ganglia zijn ophopingen van cellen van neuronen buiten het CZS (spinale ganglia, sympathische en parasympathische ganglia), omgeven door mantelcellen (vergelijkbaar met oligodendrocyten in CZS). Tenslotte onderscheiden we **zenuwvezels**. Dit zijn uitlopers van zenuwcellen, in periferie omgeven door cellen van Schwann (vergelijkbaar met oligodendrocyten in CZS) en bindweefsel (endoneurium).

In neurotoxicologie wordt vaak gebruik gemaakt van orgaanculturen en primaire culturen van neurologisch weefsel. Nadeel van dergelijke culturen is dat ze slechts voor beperkte duur kunnen in cultuur gehouden worden (niet permanent) en de complexiteit en arbeidsintensiviteit. Deze nadelen in gedachte maakt het gebruik ervan ongeschikt voor toepassing met screening als doeleinde.

Voor de evaluatie van de neurotoxiciteit van milieustalen wordt bij voorkeur gebruik gemaakt van continue cellijnen van neuroblastomas, gliomas, en pheochromocytomas.

- *Glioma C6 cellijn*: afkomstig van een chemisch geïnduceerd glioma in een volwassen rat. Deze cellijn werd in diverse toxiciteitsstudies, zoals bv van loodacetaat waar de inhibitie van GPDH (glycerol phosphate dehydrogenase) inductie wordt gebruikt als merker. *In vivo* kan dit leiden tot hypomyelinatie.
- *Neuroblastoma cellijn*: afgeleid van humane en muis-neuroblastoma's. Deze cellijnen werden gebruikt voor de screening van pesticiden omwille van de aanwezigheid van targetenzymen als AchE (acetylcholinesterase) en NTE (neurotoxisch esterase). Voorbeelden: NIE115 neuroblastoma (muis), IMR32 (humaan), SY5Y (humaan).
- *Pheochromocytoma cellijn*: worden gebruikt voor de studie van tyrosine hydroxylase activiteit. PC-12 cellijn (rat). Deze cellen synthetiseren AchE, acetylcholine, en choline acetyltransferase, alsook dopamine, norepinephrine. Ze bezitten Na-, K-, Ca-kanalen.

Om specifiek neurotoxiciteit te bestuderen worden best eindpunten gekozen die uniek zijn voor de functie van het zenuwstelsel. Verder is het mogelijk toxiciteit te vergelijken van een bepaalde stof tussen neuronale en niet-neuronale cellen.

Cytotoxiciteitstest: hoger beschreven tests voor de evaluatie van cytotoxiciteit kunnen ook toegepast worden op neuronale cellijnen.

Specifieke neurotoxiciteitstests:

- *Morfologische studie* van de cellen kan bestudeerd worden, vb effecten op de axonen en dendrieten.
- *Neurotransmitters en hormonen*: synthese door cellijnen van neurotransmitters, acetylcholine en catecholamines.

Literatuuronderzoek heeft echter aangetoond dat neurotoxiciteitstests *in vitro* (nog) niet worden toegepast voor de studie van luchtpolluenten.

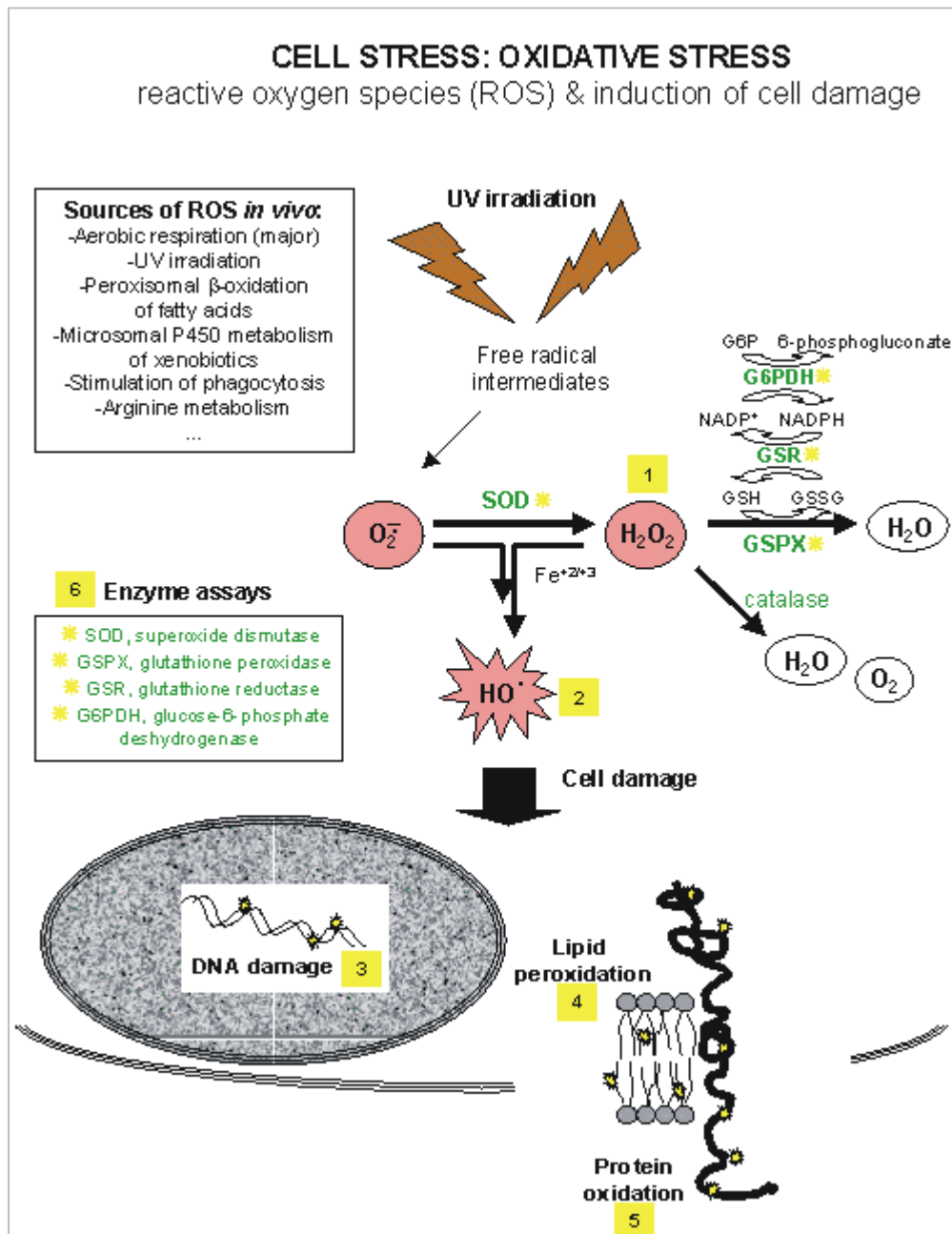
2.5 Cardiovasculaire toxiciteit

Epidemiologische studies hebben uitgewezen dat pieken van concentraties fijn stof een toename veroorzaken van het aantal cardiovasculaire ziektes en sterftes. Een aantal parameters die betrekking hebben op cardiovasculaire functies worden beïnvloed door fijn stof partikels. Blootstelling aan fijn stof veroorzaakt een toegenomen risico op ischemie en een myocardiaal infarct.

De evaluatie van cardio-vasculaire toxiciteit kan momenteel nog niet uitgevoerd worden aan de hand van *in vitro* tests, enkel systemen met dierproefmodellen zijn voorhanden.

2.6 Oxidatieve stress en vorming van reactieve zuurstofdeeltjes (ROS)

Luchtpolluenten kunnen vrije radicalen induceren, wat aanleiding geeft tot oxidatieve stress. Oxidatieve stress kan aanleiding geven tot celschade en celdood, inflammatie en oxidatieve DNA-schade. In onderstaande figuur wordt de pathway van ROS duidelijk. Er zijn diverse methoden voorhanden om *in vitro* oxidatieve stress te meten.



Figuur 2: schema oxidatieve stress en meting van schade op cellulair niveau

DPPH assay

Een acellulaire screeningsassay waarbij 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), een stabiel radicaal, wordt gereduceerd tot 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine door antioxidantia. Deze reductie kan gemeten worden door absorptantie te bepalen bij 540nm.

H2O2 assay

Fotometrische assay, acellulaire screening, gebaseerd op de kwantificatie van H₂O₂ in reactiemedium nadat het gevangen wordt door een specifiek reagens.

ROS gerelateerde enzymen

Tests voor de activiteit van stalen op geselecteerde ROS-gerelateerde enzymen zoals glutathion gerelateerde, catalase, G6PDH...

Tests voor DNA-schade

Voorbeeld komeetttest, deze wordt besproken in het hoofdstuk genotoxiciteit (zie 3.2.1.3.1.).

2.7 Hepatotoxiciteit

Stoffen die voorkomen in de buitenlucht als gehalogeneerde koolwaterstoffen kunnen aanleiding geven tot hepatotoxiciteit. Acute blootstelling aan hoge concentraties kan resulteren in schade aan levercellen. Deze concentraties zijn echter irrelevant bij milieublootstelling. Chronische blootstelling kan *in vitro* niet bestudeerd worden. Vandaar wordt dit eindpunt niet verder besproken.

3 GENOTOXICITEIT

3.1 Algemeen

3.1.1 Biologische betekenis van mutaties.

Mutaties, veranderingen in het erfelijk materiaal, zijn uiteraard van het grootste belang in termen van de genetische gezondheid van de komende generaties. De overgrote meerderheid der mutaties zijn inderdaad verliesmutaties die één of andere biologische functie uitschakelen of verstoren. Mutaties in eicel of spermatozoïd kunnen dan ook aanleiding geven tot het afsterven van embryo of foetus (en dus tot een vermindering van de vruchtbaarheid) of tot congenitale afwijkingen. De populatiegenetica leert dat een te hoge mutatiefrequentie zelfs onverenigbaar is met het voortbestaan van de species. Mutaties in lichaamscellen spelen een rol bij het ontstaan van een aantal belangrijke ziekten, waaronder vermoedelijk atheromatose en zeker kanker. Hieronder wordt dieper ingegaan op het belang van mutaties in de inductie van kanker.

3.1.2 Belang van mutaties in het ontstaan van kanker

3.1.2.1 Enkele essentiële inzichten in het proces der carcinogenese

Kanker is een ziekte van de sociale organisatie van de cellen in weefsels. Kankercellen delen en verplaatsen zich, ook als dit in functie van het organisme in zijn geheel niet past. De laatste tientallen jaren heeft de moleculaire celbiologie ons een vrij goed inzicht verstrekt in het complexe meerstappenproces der carcinogenese. Vast staat dat de accumulatie van mutaties (wijzigingen van het erfelijk materiaal) in meerdere genen (dus meerdere eigenschappen) in één cel vereist is (McCormick & Maher, 1994). In het zoogdierenorganisme (ook bij de mens) vloeit het risico van kanker wellicht voort uit de opstapeling van mutaties in stamcellen, die (bijna) de enige delende cellen zijn waarvan de afstamming lange tijd in het organisme aanwezig blijft (Heddle, 1999). Volgens Renan (1993) zouden kankers bij kinderen veroorzaakt worden door een kleiner aantal postnatale somatische mutaties (3 voor beendertumoren en tumoren van de neus) dan kankers bij volwassenen (6 voor beendertumoren en tumoren van de neus, 7 of 8 voor kankers van de maag, pancreas, nieren, huid en colon en rectum, en zelfs 12 voor prostaatkanker die vooral op hoge leeftijd voorkomt). Heden ten dage wordt niet meer betwist dat tumorcellen allen afstammen van één gemeenschappelijke voorlopercel (Fialkow, 1976), die op een bepaald ogenblik - gewoonlijk 20 tot 30 jaar voor de manifestatie van de tumor -, een (of meer) beslissende wijzigingen (mutaties) in haar erfelijk materiaal (haar DNA) ondergaan heeft, en zo geïnitieerd werd voor de carcinogenese. Tijdens de daarop volgende tumorpromotiefase zou er dan een clonale expansie plaatsgrijpen van reeds gemuteerde, voor kanker geïnitieerde cellen. Deze clonale expansie (vorming van een grote groep cellen uit één enkele cel), drijft de waarschijnlijkheid op dat bijkomende mutaties, nodig voor de kwaadaardige tumorale transformatie, kunnen plaatsgrijpen. Tijdens de tumorpromotiefase zou, mee onder invloed van exogene agentia (epigenetische carcinogenen en/of tumorpromotors zoals dioxineachtige stoffen), de expressie van recessieve allelen en meer in het algemeen, de expressie van het tumorale fenotype, mogelijk worden. Tijdens de latere fase van de tumorprogressie, waarin kankercellen met een meer kwaadaardig karakter ontstaan, spelen bijkomende (eventueel grote) wijzigingen van het erfelijk materiaal wellicht nog een rol. Het kankerproces is een soort Darwiniaans proces, waarin individuele cellen steeds meer nieuwe eigenschappen verwerven, die hen beter geschikt maakt om in de (ongunstige) omstandigheden binnenin een tumor te overleven, naburig weefsel te invaderen of om zich in een ander weefsel te gaan nestelen (metastase).

Immunologische reacties kunnen mede bepalen of, waar en in welke mate gemuteerde cellen zich tot een tumor of een metastase kunnen ontwikkelen;

3.1.2.2 *Het verband tussen mutatietempo en kankerrisico*

Het ontstaan van kanker berust op een mutatie van meerdere genen in een eenzelfde cel. Elk van deze mutaties is een zeldzame kritische gebeurtenis. De waarschijnlijkheid van het ontstaan van kanker kan bij benadering gegeven worden door het product van de waarschijnlijkheid van iedere kritische gebeurtenis apart (Armitage, 1985). Daarom kan aangenomen worden dat de incidentie van kanker stijgt met de n^{de} macht van het mutatietempo. Een kanker die zou ontstaan als gevolg van de accumulatie van drie welbepaalde onafhankelijke mutaties (elk in een gen dat slechts in één exemplaar voorkomt in het genoom), zou 1.000 maal frequenter voorkomen als het mutatietempo met een factor 10 zou toenemen. Een grote toename in dit mutatietempo is dan ook onverenigbaar met het leven van een complex organisme. Met een 10-maal hogere mutatietempo zou de evolutie wellicht niet verder geleid hebben dan tot organismen van de complexiteit van een bananenvlieg (Alberts et al., 1994). Wellicht is de kankerincidentie die we heden ten dage kennen dan ook het gevolg van slechts een geringe stijging in het gemiddelde mutatietempo van alle cellen in het lichaam, inclusief de mutatorfenotypecellen die aanwezig zijn. De huidige incidentie van kanker in Westerse landen is ongeveer 4 tot 5 maal hoger dan de "basale" kankerincidentie, nl. de incidentie van kankers die veroorzaakt worden door spontane mutaties. Deze basale kankerincidentie kan afgeleid worden uit de som van de incidenties van elke soort kanker in de streek waar deze vorm van kanker het minst voorkomt. De verschillen in incidentie tussen verschillende populaties zijn inderdaad niet te wijten aan etnische (genetische) verschillen, maar aan verschillen in levensstijl en omgevingsfactoren. Een stijging met 26% in het mutatietempo in de cellen betrokken in de spontane carcinogenese volstaat om de incidentie van kanker, veroorzaakt door mutaties in 6 genen, met een factor 4 te doen toenemen, en kan dus de huidige incidentie verklaren.

3.1.3 Enkele eigenschappen van genotoxische carcinogenen.

De term "genotoxisch carcinogeen" wordt hier gebruikt voor een agens dat kanker induceert door een directe interactie met DNA resulterend in genetische veranderingen, d.i. veranderingen in de DNA sequentie. De belangrijkste gegevens i.v.m. genotoxische carcinogenen zijn samengevat in onderstaande tabel.

Genotoxische carcinogenen:

- meestal geen kritische drempel
- meestal metabole activatie vereist
- effect van verschillende en/of opeenvolgende blootstellingen is additief of synergistisch. Het kankerverwekkend effect van een welbepaalde dosis van een genotoxische kankerverwekkende stof neemt toe naarmate de populatie die de blootstelling ondergaat, een hoger mutatietempo vertoont tengevolge van diverse andere blootstellingen
- blootstelling : lage dosis van groot aantal verschillende carcinogenen
- relatief belangrijker op jonge leeftijd
- mutaties: dosis-antwoord \pm lineair
- kanker: Wanneer men het risico voor het ontstaan van kanker bij hoge dosis op lineaire wijze extrapoleert naar het risico bij lage dosis, dan bekomt men een overschatting bij lage dosis met een factor van maximaal 2 à 3. Bij lage dosis is het dosis-effect verband nagenoeg met zekerheid lineair, of misschien zelfs supralineair met een relatief sterker effect bij zeer lage dosis.
- kunnen ook epigenetische effecten hebben (o.a. doorheen AhR)
- Genotoxische carcinogenen veroorzaken meestal kanker in verschillende species, in beide geslachten, bij intermediaire dosissen en niet noodzakelijk slechts in één doelwit weefsel.

Enkele definities:

Mutatie: elke in de dochtercellen overerfbare genetische verandering

Mutageen: agens dat mutaties veroorzaakt

Genmutatie: een wijziging in de DNA basesequentie; de chromosoomstructuur is niet veranderd

Chromosoommutatie: wijziging van de chromosoomstructuur

Genoommutatie: wijziging in het normale chromosomenaantal

Aneuploidie: toestand waarbij cellen of individuen een abnormaal aantal chromosomen hebben

Clastogeen: agens dat breuken in chromosomen veroorzaakt

Aneugeen: agens dat wijzigingen in het aantal chromosomen per cel veroorzaakt.

3.1.4 Strategie voor detectie van genotoxische activiteit: enkele noties

De strategie voor detectie van genotoxische activiteit omvat in eerste instantie twee *in vitro* tests: een bacteriële mutageniciteitstest (OECD Test Guideline [TG] 471 meestal de Ames test met *Salmonella*, soms *Escherichia coli*) en een cytogenetische test (OECD TG 473) meestal een metafase analyse met humane lymphocyten of met knaagdiercellijnen. Het is inderdaad nodig zowel tests voor genmutaties als voor chromosomale en genoommutaties in te sluiten. Ook bestaat de mogelijkheid genetisch gewijzigde cellijnen te gebruiken die één of meer fase I of fase II detoxificatie (metabolisatie) enzymen tot expressie brengen, dit om, zonder exogeen metaboliserend preparaat, de genotoxische activiteit te detecteren van stoffen die metabool moeten geactiveerd worden. Eventueel wordt, in tweede instantie, een "short-term" *in vivo* test aangewend.

Voor biomonitoring op milieustalen lijken een bacteriële mutageniciteitstest, eventueel aangevuld met een cytogenetische test, aangewezen en voldoende.

3.2 Kandidaattests voor screenen van genotoxiciteit

3.2.1 Tests voor genotoxische schade

3.2.1.1 Tests voor genotoxische schade bij bacteriën (prokaryoten)

3.2.1.1.1 Inleiding met betrekking tot gebruik van bacteriën

Bacteriële systemen zijn de meest verspreide tests voor mutageniciteit/ genotoxiciteit. Bacteriën bevatten DNA in de vorm van een enkel lineair of circulair chromosoom en hebben niet de organisatie van eukaryote cellen. Hierdoor zullen DNA-interacties direct impliceren in chemisch geïnduceerde mutagene effecten. Bacteriële cellen hebben geen nucleair membraan en een permeabele celwand waardoor chemicaliën gemakkelijk kunnen binnendringen. Bacteriële cellen delen snel, waardoor grote aantallen kunnen getest worden over vele generaties gedurende verschillende stadia van groei en deling. Hun grootste voordelen zijn ook hun grootste nadelen. Het simpele enkele chromosoom verschilt sterk van de chromosomen in zoogdiercellen; agentia die breuken, recombinatie of niet-binding van chromosomen veroorzaken kunnen niet gedetecteerd worden.

Bacteriële testsystemen voor genetische toxiciteit kunnen onderverdeeld worden in twee hoofdtypes:

- Systemen die mutaties meten, de meest gebruikte bacteriële tests hiervoor zijn: de *Salmonella tyhimurium* his⁻ reverse mutatie test en de *E. Coli* trp⁻ reverse mutatie test. Deze testsystemen zullen verder behandeld worden in paragraaf 3.2.2 Tests voor genmutaties.
- Systemen die DNA schade meten, zijn systemen waarbij DNA schade leidt tot inductie of expressie van specifieke DNA schadeherkenningsenzymen. Hierbij worden geen mutaties gemeten maar schade door gebeurtenissen in het DNA welke tot mutatie, enzyme inductie of celdood kunnen leiden. Hieronder worden o.a. tests verstaan die het differentieel verschil in schade meten tussen DNA met en zonder een herstelmechanisme, de zogenaamde PolA; recA tests. Volgende paragrafen geven een overzicht van de voornaamste bacteriële genotoxiciteitstests.

3.2.1.1.2 Mutatox

a. Principe

De mutatox is gebaseerd op een donkere variant van het luminescente bacterie *Vibrio fischeri*, Genotoxische schade gaat het herstel van de luminescentie via SOS-activatie induceren. Immers, het SOS-syteem gaat bij DNA schade een protease produceren dat de onderdrukking van de lux-route teniet doet en dus de luminescentie activiteit gaat herstellen. Deze luminescentie is een maat voor de genotoxische potentie van het geteste staal.

De test is gevoelig voor agentia welke base substitutie of frameshift veroorzaken, voor DNA synthese inhibitors en voor DNA- intercalerende agentia. De test is ontwikkeld door Microbics Corp. (Carlsbad, CA, USA 1993).

b. Protocol types

Het Mutatox test protocol is opgesteld door Microbotics Corp. Het is commercieel beschikbaar onder de vorm van een testkit. In functie van de geteste verdunningsreeks wordt de genotoxische respons weergegeven als de Lowest Observed Effect Concentration of LOEC-waarde.

3.2.1.1.3 Umu-test

a. Principe

De *umu* test is gebaseerd op de expressie van het *umu* operon door inductie met DNA-schadende agentia. Het *umu C* gen staat in verbinding met een reeks schade induceerbare genen (*recA*, *lexA* en *umuD*) en is betrokken in de bacteriële mutagenese via de zogenaamde SOS- route. Dit bacterieel SOS- respons systeem wordt geactiveerd door DNA schade in de cel en wordt gereguleerd (onderdrukt) door LexA en RecA proteïnen. De teststam vertrekt van *Salmonella typhimurium* TA98 als precursor met een *umuC-lacZ* gen construct (plasmide pSK1002). Het *lacZ* is het structurele gen voor β -galactosidase, de inductie van de SOS-respons door genotoxische agentia kan bepaald worden door het meten van de resulterende β -galactosidase activiteit.

De genotoxische en mutagene gebeurtenissen die met de *umu*-test gedetecteerd worden staan in verband met verstoringen via de error-prone herstel route.

b. Protocol types

- Proefbuis methode ontwikkeld door Oda et al. (1985)
- Multiwell (microtiter) methode ontwikkeld door Reifferscheid et al. (1991).

In beide methodes wordt β -galactosidase activiteit gemeten met behulp van een fotospectrometer. De genotoxische activiteit wordt uitgedrukt in β -galactosidase eenheden en in enzym inductie ratios.

c. Test stammen

- *Salmonella tyhimurium* TA1535/pSK1002
- *Salmonella tyhimurium* NM2009: O-acetyl-transferase overproducerende afgeleide van parentale TA1535 (met vector plasmide pACY184).
- *Salmonella tyhimurium* NM3009 O-acetyl-transferase en nitro-reductase overproducerende afgeleide van parentale TA1535 (met vector plasmide pACY184).

3.2.1.1.4 SOS chromotest

a. Principe

De SOS chromotest werd ontwikkeld door Quillardet et al. (1985) en verschilt hoofdzakelijk van de *umu*-test door het gebruik van een *E. coli* stam; de *E. coli* PQ37 (Quillardet en Hognung, 1985). Deze teststam vertrekt van *E. coli* K-12 als precursor.

Door introductie van een *sfiA::lacZ* fusie operon, waarbij het β -galactosidase gen *lacZ* onder controle staat van het *sfiA* gen (één van de SOS cascade genen). De expressie van dit enzym is volledig afhankelijk van de inductie van het SOS-systeem door genotoxische agentia. De resulterende β -galactosidase activiteit is dus een maat voor de genotoxische activiteit van staal

b. Test Protocols

Microtiter(multiwell) protocol. De respons wordt uitgedrukt in SOS inductie potentie (SOSIP).

c. Test stammen

E. coli PQ37

3.2.1.1.5 Vitotox test

a. Principe

De Vitotox test is een bacteriële test, zoals de SOS chromotest en *umu* test, gebaseerd op de expressie van herstel genen geïnduceerd door genotoxische stoffen. Het bacterieel SOS systeem is een DNA herstel mechanisme dat onmiddellijk reageert bij DNA schade.

De bacteriële stam gebruikt in de VITOTOX[®] is de TA104 RecN2-4 welk een *lux* operon van het luminescente marine micro-organisme *Vibrio fischeri* bezit onder controle van het recN gen, welk deel uitmaakt van het SOS herstelmechanisme. Wanneer onder invloed van een genotoxische stof de RecN promotor onderdrukt wordt, resulteert dit in de expressie van het lux operon en dus lichtproductie. Sommige stoffen interfereren met dit lichtemissiesysteem en stimuleren zo de lichtemissie zonder enige genotoxische potentie (vals positief). Andere interfereren negatief of zijn bacteriotoxisch en reduceren de lichtemissie, hierdoor kunnen aanwezige genotoxische effecten gemaskeerd worden. Om het effect van deze stoffen te bepalen wordt gelijktijdig een tweede bacteriële stam, TA 104 pr1 gebruikt. Dit construct zorgt voor een hoge achtergrond lichtemissie. Stoffen die interfereren met de lichtemissie worden met deze stam (pr1) gedetecteerd zodat de genotoxische respons hiervoor gecorrigeerd kan worden (van der Lelie et al. 1997).

b. Test protocols

De VITOTOX[®] test wordt uitgevoerd in 96 of 384 multiwell platen, de wells worden gevuld met opeenvolgende verdunningen van het staal en de bacteriële mix. De luminescentie wordt in elke well om de 5 minuten gemeten en dit gedurende 4 uur.

c. Teststam

TA104Rec en pr1

3.2.1.2 Tests bij gisten (eukaryote cellen)

3.2.1.2.1 Inleiding met betrekking tot gebruik van gisten

Tests met gistcellen zijn gevoelig voor mutagenen die verschillende genetische eindpunten induceren: aneuploidie, chromosomale breuken, puntmutaties en gebeurtenissen die leiden tot mitotische recombinatie. Het voordeel van de gistcellen tegenover prokaryotische tests zijn hun eukaryote karakteristieken; gelijktijdige detectie van diverse gebeurtenissen van genetische schade in stabiele diploïde cellen en de aanwezigheid van het cytochroom P450 systeem welk een heel reeks pro-mutagen kan activeren. Het voornaamste nadeel, tegenover bacteriële testsystemen is de beperkte permeabiliteit van gistcellen en daardoor lagere gevoeligheid. Dit nadeel werd overwonnen door introductie van een *ts1* mutatie onder homozygote condities in de diploïde D7 stam van *Saccharomyces cerevisiae* (Staleva et al. 1996) (zie ook 3.2.2.2 Gist mutatie tests.)

3.2.1.2.2 Yeast genotoxicity screen (GreenScreen assay)

a. Principe

Een gisttest gebaseerd op een DNA herstel reporter systeem: RAD-54-GFP. RAD-54 maakt deel uit van DNA herstel genen en codeert voor structurele elementen van de homologe recombinatie-herstel-route. Inductie van deze RAD-54 promotor door DNA schade resulteert in productie van GFP: green fluorescent proteïne. Het gehele genoom is een doel voor mogelijke DNA schade, de fluorescentie is een maat voor de geïnduceerde DNA schade.

b. Test protocol (Cahill et al., 2004)

Microwell platen

3.2.1.3 Tests bij zoogdier – en humane cellen (eukaryote cellen)

3.2.1.3.1 Komeet test of "single cell gelelektroforese".

Deze techniek wordt ook "Comet assay" genoemd, naar de vorm van de beelden ('kometen') die onder de microscoop waargenomen worden. Het is een microgelelektroforesetechniek die toelaat DNA-schade cel per cel op te meten. De alkalische versie, geïntroduceerd door Singh

et al. in 1988, detecteert DNA-breuken, alkali labiele sites, open repair sites en crosslinks. Voor deze techniek worden cellen gemengd met agarosegel, die uitgespreid wordt op microscoopslides. De cellen worden gelyseerd met hoge zoutconcentraties en detergenten. Vervolgens wordt het overblijvend nucleair DNA gedenatureerd in een alkali buffer en geëlectroforeerd in diezelfde buffer. De DNA fragmenten migreren uit de nucleus, naar de positieve pool toe. Na electroforese worden de preparaten gekleurd met een fluorochroom, bv. ethidiumbromide. Een beeldanalysesysteem wordt gebruikt om verscheidene schadeparameters te meten. De meest nuttige zijn 'tail length' (TL), gemeten van het midden van de nucleus tot het einde van de 'staart', het percentage aan DNA in de 'staart' (TD) en 'tail moment' (TM = TL x TD).

Om de detectie van oxidatieve DNA schade toe te laten, kan het Fpg enzyme (Formamidopyrimidine DNA glycosylase), dat voornamelijk hydroxydeoxyguanine en zogehete Fpg-gevoelige sites detecteert, toegevoegd worden (Hartwig et al., 1996).

3.2.1.3.2 SCE test of "sister chromatid exchange test".

Sister chromatid exchanges (SCEs) zijn het gevolg van breuken in beide DNA strengen, gevolgd door een uitwisseling van gehele DNA duplexen. Dit komt voor tijdens de S fase en wordt geïnduceerd door mutagenen die DNA adducten vormen of interfereren met DNA replicatie. De vorming van SCEs werd gecorreleerd met recombinatoire repair en de inductie van puntmutaties, genamplificatie en cytotoxiciteit.

De SCE test wordt meestal uitgevoerd op menselijke perifere bloed lymfocyten. Aangezien perifere lymfocyten zich in het G₀ stadium van de celcyclus bevinden, moeten ze om metafasen te bekomen tot delen gestimuleerd worden door een specifiek antigeen, bv. phytohaemagglutinine. Om een voldoende aantal mitotische cellen te bekomen, kan een spoelfiguurinhibitor zoals colcemide toegevoegd worden kort voor fixatie (na 72 u), om de cellen te blokkeren in de (pro)metafase van de tweede mitose.

Om een differentiële kleuring toe te laten die de onderzoeker toelaat beide chromatiden te onderscheiden, wordt BrdU (bromo-deoxy-uridine) toegevoegd aan het cultuurmedium gedurende twee hele celcycli. Chromatiden met enkel één DNA streng met geïncorporeerd BrdU vertonen een normale donkere Giemsa kleuring, terwijl deze met twee gesubstitueerde strengen minder donker kleuren. Als er een uitwisseling ('exchange') plaatsvond, kan dit waargenomen worden als een donker deel dat verplaatst is naar de andere arm: "harlekijn chromosomen".

De techniek kan ook gebruikt worden om de celdelingsnelheid in te schatten, aangezien de eerste metafasen uniform donker kleuren.

3.2.2 Tests voor genmutaties (puntmutaties, kleine deleties en inserties)

3.2.2.1 Tests bij bacteriën

3.2.2.1.1 Salmonella tyhimurium his⁻ reverse mutatie test of Ames test

a. Principe:

De Salmonella/Ames test is een bacteriële mutageniciteitstest waarbij de His⁻ → His⁺ mutaties zichtbaar worden gemaakt door de Salmonella bacterie uit te platen op een histidine-arme voedingsbodem. De Salmonella typhimurium stammen zijn immers genetisch gemodificeerd in hun histidine-operon (His⁻), hierdoor kan de bacterie enkel groeien door het toevoegen van histidine. Onder invloed van mutagene stoffen kunnen deze gemodificeerde bacteriën echter terugmuteren waardoor ze wel uitgroeien tot kolonies zonder aanwezigheid van histidine. Het aantal gevormde kolonies is een maat voor de mutagene potentie van het geteste staal. Er zijn in de loop der jaren heel wat teststammen ontwikkeld, elke stam bezit een mutatie in één van de genen coderend voor de histidine biosynthese maar aanvullend

zijn er verschillende genetische modificaties (uvrB, rfa, pKM101) mogelijk die de gevoeligheid van de stam gaan bepalen. Van de belangrijkste stammen wordt in paragraaf c een overzicht gegeven.

b. Protocol types:

- Standaard plaat incorporatie test (Ames et al., 1973).

Klassieke testopzet: staal/ toxicant in oplossing wordt met de nodige agentia/vaste agar uit geplaat. Na incubatie bij 37°C voor 48u worden het aantal kolonies uitgegroeid op de plaat gescoord. Resultaten worden uitgedrukt in een aantal mutanten/ plaat of mutanten/ hoeveelheid toxicant(of staal) toegevoegd. Een staal/ toxicant wordt als positief beoordeeld als er een logische dosis-respons curve is en het aantal mutanten minimaal 2x de achtergrond aantal is (spontane mutanten).

- Preïncubatie test

Idem als standaard plaat incorporatie test, maar vooraf wordt de test stam voor korte periode blootgesteld aan toxicant (of staal). Dit verhoogt de gevoeligheid vooral voor kortlevende mutagene metabolieten.

- Kado microsuspensie test (Kado et al., 1983)

Variatie op de standaard plaat test geschikt voor kleine testvolumes, met een hogere gevoeligheid. Door centrifugatie wordt de celdensiteit van de testcultuur verhoogd.

- Fluctuation test (multiwell, microtiter)

In tegenstelling tot de hierboven beschreven protocols wordt er in de fluctuation test geen agar platen gebruikt maar multiwells met groeimedium in oplossing. Het testmedium heeft een pH = 7, wanneer een well groeiende kolonies bevat (mutanten, revertanten) daalt de pH. Bromocersol purper wordt toegevoegd als indicator en slaat om van purper naar geel vanaf pH 5.2 of lager het aantal positieve (geel) wells worden gescoord per 48 wells. Aflezen gebeurt manueel of automatische (OD 492nm). Automatisatie is mogelijk. Respons wordt weergegeven in het aantal positieve wells per 48 of in de mutageniciteits ratio (positieve wells staal multiwellplaat/ blanco plaat).

Er is een commerciële multiwell test beschikbaar: de AMAX test procedure (Ames II™ Mutagenicity Assay by Xenometrix) deze maakt gebruik van specifiek ontwikkelde TA

c. *Salmonella typhimurium* teststammen

- Basis stammen

In tabel 7 zijn de genotypes van de basis teststammen weergegeven. Alle stammen zijn histidine afhankelijk door een mutatie in één van de histidine operons (kolom1). Daarnaast onderscheiden de stammen zich door aanvullende mutaties en/of genetische alteraties die de gevoeligheid voor specifieke mutagenen of een chemische klasse bepalen (kolom 2):

- rfa mutatie zorgt voor een defect in de liposaccharide laag welke het bacteriële oppervlak coat, dit verhoogt de permeabiliteit van de bacterie (vooral voor grotere moleculen).
- uvrB-bio: defect in biotine gen coderend voor het DNA herstel systeem, maakt de bacterie afhankelijk van biotine, verhoogd de mutatie gevoeligheid.
- pKM101: R-factor plasmide, bevordert chemische en UV- geïnduceerde mutagenese door inductie van error-prone DNA recombinatie herstel systeem, maakt de bacterie ampiciline resistent.
- pAQ1: multicopy plasmide, maakt de bacterie tetracycline resistent.

In kolom 3 is de aard van de terugmutatie in het histidine operon weergegeven.

Tabel 7: Overzicht van de basis teststammen met hun genotype

ALLEL/ STRENG	KENMERKENDE MUTATIES EN/OF GENETISCHE ALTERATIES*	TERUGMUTATIE EVENT
hisG46/ TA1535 TA100	gal, Δ(chl, uvrB-bio), rfa gal, Δ(chl, uvrB-bio), rfa en pKM101, Ap ^r	Basenpaar substitutie
hisD3052/ TA1538 TA98	gal, Δ(chl, uvrB, bio), rfa gal, Δ(chl, uvrB, bio), rfa en pKM101, Ap ^r	Frameshift
hisD6610/ TA97	gal, Δ(chl, uvrB, bio), rfa en pKM101, Ap ^r	Frame schift
hisG428/ TA102 TA104	Wildtype en rfa, pKM101 en pAQ1 gal, Δ(chl, uvrB, bio), rfa	Transitie/ tranversie

*Δ: deletion; Ap^r : Ampicillin resistent

Voor de vloeistof versie in microtiter platen (fluctutation) werd de TA7000 serie ontwikkeld. Het gebruik van een testversie in oplossing laat toe een bacteriële mix van deze 6 stammen te gebruiken. Kenmerken van TA7000 serie is weergegeven in tabel 8.

Tabel 8: Stammen van de Ames II 7000 serie.

ALLEL/ STRENG	KENMERKENDE MUTATIES EN/OF GENETISCHE ALTERAT	BASENPAARSUBSTITUTIE
hisG1775/TA7001	uvrB/rfa/ pKM101	AT → GC
hisC9138/TA7002	idem	TA → AT
hisG9074/TA7003	idem	TA → GC
hisG9133/TA7004	idem	GC → AT
hisG9130/TA7005	idem	CG → AT
hisG9070/TA7006	idem	CG → GC

- Afgeleide stammen

Opdat aromatische nitro- of amino derivaten enige mutagene activiteit zouden induceren, vereist dit respectievelijk reductie of oxidatie van hun functionele groepen tot de corresponderende hydroxylamines. Daarom zijn vertrekkende van de stammen TA98 en TA100 verschillende varianten ontwikkeld met verhoogde nitroreductase en/of O-acetyltransferase activiteit. Naast stammen met over-geïnduceerde enzymatische activiteit zijn er andere stammen waarbij deze activiteit onderdrukt is. Hiermee is het mogelijk in een complex milieumengsel de bijdrage van nitro-componenten tot de totale mutagene activiteit in te schatten: bij overgeïnduceerde stammen zal de activiteit van nitro-derivaten uitvergroet worden, bij deficiënte stammen zal hun bijdrage wegvallen. Onderstaande tabel 9 geeft een overzicht van deze afgeleide stammen.

Tabel 9: Overzicht test stammen met verhoogde of gereduceerde nitroreductase/ O-acetyltransferase activiteit.

ALLEL/ STRENG	KENMERKENDE MUTATIES EN/OF GENETISCHE ALTERATIES*	TERUGMUTATIE EVENT
hisG46/ TA100/1,8DNP YG1029 YG1026 YG1042	TA100 en deficiënt in OAT activiteit TA100 en overinductie OAT activiteit TA100 en overinductie NR activiteit TA100 en overinductie OAT en NR activiteit	Basenpaar substitutie
hisD3052/ TA98/1,8DNP ₆ TA98/NR YG1024 YG1021 YG1041	TA98 en deficiënt in OAT activiteit TA98 en deficiënt in NR activiteit TA98 en plasmide pBR322: overinductie OAT activiteit TA98 en overinductie NR activiteit TA98 en overinductie OAT en NR activiteit	Frameshift

*OAT: O-acetyltransferase; NR: nitroreductase

- Recentere (minder courante) afgeleide teststammen
- O-acetyltransferase deficiënte stammen YG7130 en YG7126 respectievelijk afgeleid van TA98/1,8DNP₆ en TA100/1,8DNP. Beiden zijn chloramphenicol resistent (Cm^r).
- 8-Hydroxyguanine (8-OH-G) DNA glycosydase deficiënte stammen met een verhoogde gevoeligheid voor oxidatieve mutagenen. Verkregen door deletie van het mutM_{ST} gen in TA1535, TA102 en TA1975 stam. Dit resulteert in drie nieuwe stammen; YG3001 (TA1535 ΔmutM_{ST}), 3003 (TA102 ΔmutM_{ST}) en YG3002 (TA1975ΔmutM_{ST}), resistent voor kanamycine (Km^r).
- O⁶- methylguanine DNA methyltransferase deficiënte stammen met een verhoogde gevoeligheid voor alkylerende mutagenen. Verkregen door deletie in de ada_{ST} en/of ogt_{ST} genen in de TA1535 en TA100 stam. Dit resulteert in zes nieuwe stammen; YG7100 (TA1535 Δ ada_{ST}, YG7104 (TA1535 Δ ogt_{ST}), YG7108 (TA1535 Δ ada_{ST} en Δ ogt_{ST}), YG7119 (TA100 Δ ada_{ST}), YG7112 (TA100 Δ ogt_{ST}) en YG7113 (TA100 Δ ada_{ST} en Δ ogt_{ST}).

3.2.2.1.2 Escherichia coli trp⁻ reverse mutatie test

a. Principe:

De *E. Coli* test is ook een bacterietest waarbij de His⁻ → His⁺ mutaties zichtbaar worden gemaakt door de Salmonella bacterie uit te platen op een histidine-arme voedingsbodem. De *Salmonella typhimurium* stammen zijn immers genetisch gemodificeerd in hun histidine-operon (His⁻), hierdoor kan de bacterie enkel groeien door het toevoegen van histidine. Onder invloed van mutagene stoffen kunnen deze gemodificeerde bacteriën echter terugmuteren waardoor ze wel uitgroeien tot kolonies zonder aanwezigheid van histidine. Het aantal gevormde kolonies is een maat voor de mutagene potentie van het geteste staal.

De *E. coli* test is ook een testsysteem gebaseerd op terugmutaties (reversies), maar hier is het de Trp⁻ → Trp⁺ mutatie die gevisualiseerd wordt door de *E. coli* bacterie te doen groeien in een tryptofaanarm medium. De teststammen zijn dus auxotrofe mutanten (trp⁻) die enkel kunnen groeien door toevoeging van tryptofaan. De specifieke doelsite voor deze terugmutatie is de "oker" (UAA) nonsense mutatie. Een "oker" mutatie kan ongedaan gemaakt worden door een base substitutie overal in het specifieke chromosoom. Het bacterieel systeem is hierdoor gevoelig voor elk type van base substituerende mutagenen.

b. Protocol types:

- Standaard plaat incorporatie test
- Preïncubatie test.
- Kado microsuspensie test

Zoals beschreven voor de Salmonella reverse mutatie test

c. E. coli test stammen

Twee stammen van *Escherichia* zijn algemeen in gebruik: WP2uvrA en WP2uvrA(pKM101), beiden deficiënt voor DNA repair (uvrB) en één ervan is drager van het plasmide pKM101.

De twee meest gebruikte *Escherichia* teststammen zijn WP2uvrA en WP2uvrA(pKM101), beiden defect in het biotine gen coderend voor het DNA herstel systeem en een van hen draagt ook een pKM101 plasmide. De IC203 - 208 reeks zijn stammen vertrekkende van deze twee WP2 stammen maar met aanvullende modificaties waardoor ze een hogere gevoeligheid vertonen voor oxidatieve mutagenen. Tabel 10 geeft een overzicht van deze stammen en hun genetische kenmerken.

Tabel 10: Overzicht E. Coli teststammen

STAM	BASIS GENOTYPE	AANVULLENDE GENETISCHE ALTERATIES
WP2	Wildtype	
WP2	pKM101	
WP2	uvrA	
WP2	uvrA(pKM101)	
IC203	WP2uvrA(pKM101)	Deficiënt in OxyR functie
IC204	WP2uvrA	umuDC::cat mutatie
IC206	IC204	mutY::kan derivaat
IC208	IC206	oxyR30

3.2.2.2 Tests bij gisten

3.2.2.2.1 Mitose gen conversie test met *Saccharomyces cerevisiae*

a. Principe:

Deze test meet de conversie van inactieve differentiële allelen naar hun wild-type geïnduceerd door mutagene stoffen. De heteroallelische diploïde giststammen dragen verschillende inactieve allelen van hetzelfde gen locus (*Trp*) waardoor ze tryptofaan vereisen om te kunnen groeien. Conversie van deze allelen naar hun actieve wild-type gebeurt via intra-gen recombinatie. Naast deze genconversie aan het *Trp-5* locus is er ook reversieanalyse aan de *ilv1-92* locus. Het gist testsysteem meet dus zowel gen conversie (*Trp 5* locus) als terugmutatie van *ilv1-92* mutant.

b. Protocol types:

Microsomale test (Del Carratore R. 1981): test wordt uitgevoerd met cellen tijdens hun logaritmische groeifase, toevoeging van 20% glucose zorgt voor maximale cytochrome P450 activiteit.

c. Teststammen

- *Saccharomyces cerevisiae* D7
- *Saccharomyces cerevisiae* D7ts1

3.2.2.3 Tests bij zoogdier – en humane cellen (eukaryote cellen)

3.2.2.3.1 Inleiding met betrekking tot gebruik van zoogdiercellen en humane cellijnen.

Voor mutageniciteitstests met zoogdiercellen zijn de belangrijkste cellijnen: Muis Lymphoma cellen, Chinese Hamster Ovaria cellen en Chinese Hamster long fibroblast cellen. De drie genetische markers gebruikt in deze testsystemen zijn HPRT, XPRT en TK. Het zijn enzymen betrokken in de biosynthese van nucleïne zuren. Het zijn allen 'forward' mutatie tests, ze detecteren immers mutaties van het wildtype naar hun mutant fenotype. Deze 'forward' mutaties bestaan erin dat door mutaties in de genen coderend voor de HPRT, XPRT of TK enzymfuncties het inbouwen van nucleotiden bij de biosynthese wordt

geblokkeerd. Van deze nucleotiden bestaan er ook toxische analogen die wanneer ze in het DNA worden ingebouwd celsterfte veroorzaken. Door het toevoegen van deze nucleotiden analogen aan een groeimedium zullen de wildtype cellen afsterven, de gemuteerde fenotype cellen echter zullen geen toxische nucleotide analogen inbouwen en dus resistent zijn (zie ook verder bij bespreking individuele tests).

Mutageniciteitstests met menselijke cellen in vitro is mogelijk geworden door de ontwikkeling van menselijke β -lymfoblastoïde cellijnen die codeerden voor het endogeen cytochrome P450, een enzym betrokken in het metabolisme van verschillende pro-mutagenen. Een kort overzicht van hun ontwikkeling.

- AHH-1 is een geïsoleerde kloon van RPMI 1788 cellen (cellijn uit menselijke donor) geselecteerd voor zijn gevoeligheid voor B[a]P.
- Hieruit is de AHH-1 $tk^{+/-}$ cellijn afgeleid (Crespi and Thilly 1984), en verder gekloond tot een cellijn waarbij de thymidine (tk) kinase locus heterozygoot is (Crespi et al., 1991).
- De L3 is een variant van de AHH-1 cellijn geselecteerd voor hoge endogene cytochrome P450 1A1 niveau en zijn lagere mutant fractie aan de tk locus (Davies et al. 1989).
- De MCL-5 cellijn is afgeleid van deze L3 variant en bevat plasmiden die coderen voor vier P-450s en voor epoxide hydrolase (Crespi et al, 1991).
- Tenslotte de h1Av2 cellijn afgeleid van AHH-1 $tk^{+/-}$ met een plasmide die codeert voor additionele CYP1A1 activiteit (Penman et al.1994) en vertoont hogere gevoeligheid voor detectie van tk locus mutagenen.

Bij deze testsystemen worden dezelfde genetische markers (TK, HPRT) gebruikt als bij de zoogdiercel systemen (zie verder bij bespreking individuele tests).

De testprocedures voor deze verschillende celtypes (zoogdier en menselijke cellen) verloopt gelijkaardig. Een typische testopzet bestaat uit een range-finding test en een mutageniciteitstest. De cellen worden 3 tot 6 uur blootgesteld aan een staal/ stof zowel met als zonder metabole activatie (S9). De blootgestelde cellen krijgen nadien tot 7 dagen de tijd om zich te vermenigvuldigen, dit is nodig voor de expressie van het mutant recessieve fenotype. Hierna wordt een gekend aantal cellen overgebracht in zowel een selectief (toxische nucleotide analoog) als een niet-selectief medium. Na incubatie worden de kolonies gescoord en de mutatie frequentie afgeleid van het aantal kolonies respectievelijk in het selectieve en niet-selectieve medium.

3.2.2.3.2 Mouse lymphoma L5178 $TK^{+/-}$ assay (MLA/ TK)

a. Principe

De cellijn gebruikt muis 'lymphoma' cellen (L5178 $tk^{+/-}$) die heterozygoot in het thymidine kinase (TK) locus van het chromosoom 11. Inactivatie (mutaties in genen coderend voor TK enzymfunctie) van het tk^{+} allel maakt de cellen resistent tegen trifluorothymidine (toxisch nucleotide analoog), waardoor $tk^{-/-}$ mutante cellen (resistent fenotype) geselecteerd kunnen worden uit een achtergrond van $tk^{+/-}$ cellen (wildtype).

In deze cellijn is het heterozygote tk gen autosomaal en aanwezig in twee kopieën, hierdoor kan het tk gen herstellen van mutaties op grotere schaal. Vandaar dat de MLA niet alleen intra-gen gebeurtenissen detecteert (meestal puntmutaties) maar ook het verlies van heterozygositeit (LOH: loss of heterozygosity). De 'MLA' kan dus een grote range aan mutagene gebeurtenissen detecteren.

b. Protocol types

Er bestaan twee methodes

- Zachte agar cloning methode (Clive et al. 1972)

- Multiwell methode (Microtiter platen) cellen groeien in vloeibaar medium (Cole et al. 1983).

3.2.2.3.3 Mouse lymphoma HPRT assay (MLA/ HPRT)

Zie bespreking CHO/ HPRT test.

3.2.2.3.4 Chinese hamster ovary cells (CHO/ HPRT)

a. Principe:

HPRT (hypoxanthine–guanine–phosphoribosyl-transferase) is een enzyme wiens gen gelokaliseerd is op het X chromosoom. Dit enzym katalyseert de conversie van de puridines hypoxanthine en guanine naar nucleotiden. Puridine analogen zoals 6-mercaptipuridine, 6-thioguanine of 8-azaguanine worden ook gemetaboliseerd door HPRT, maar de gevormde nucleotiden zijn cytotoxisch en veroorzaken celsterfte. Cellen met mutaties in het HPRT gen maken geen nucleotiden aan zodat ze wel kunnen groeien in medium dat puridine analogen bevat, cellen met normaal HPRT gen sterven in dergelijk medium. Mutaties worden veroorzaakt door verschillende mechanismen (b.v. base paar substituties, punt mutaties, chromosoom aberraties)

b. Protocol types

Analoog met MLA/ TK

3.2.2.3.5 Chinese hamster ovary AS52 cells (CHOAS52/XGPRT)

a. Principe:

De AS52 cellijn meet mutaties aan het xanthine-guanine fosforibosyltransferase gen. Dit *xprt* gen is aanloog aan het heterozygote *hprt* gen.

b. Protocol types

Analoog met MLA/ TK

3.2.2.3.6 Chinese hamster V79 lungs fibroblast Cells/HPRT assay

a. Principe:

Analoog met CHO/HPRT

b. Protocol types:

Analoog met MLA/ TK

c. Cellijnen

De Chinese hamster V79 fibroblast cellijn (V79MZ) en de twee varianten met expressie van menselijk cytochrome CYP1A2 (V79MZ_{h1A2}) en CYP1B1 (V79MZ_{h1B1})

3.2.2.3.7 Menselijke β -lymfoblastoïde cellen

a. Principe:

Twee marker loci; de thymidine (tk) locus en de X- verbonden hypoxanthine phosphoribosyl transferase (hprt) locus worden gebruikt voor het detecteren van mutagene activiteit met de β -lymfoblastoïde cellijnen. De hprt locus is hemizygoot en detecteert chromosoommutaties tot 3-4 Mb. De tk locus is heterozygoot en is gevoelig voor een grotere range aan mutaties met inbegrip van verlies van heterozygositeit (LOH) en multi-loci mutaties.

b. Protocol type:

- Microtiter plate cloning assay
Groei en onderhoud van lymfoblastoïde cellijnen in suspensie culturen.
Selectie van TK⁻ en HPRT⁻ mutanten na expressie fenotype in multi-well platen.

Resultaten worden uitgedrukt in de geïnduceerde mutatie frequentie per 10x6 cellen (IMF).

c. Cellijnen.

Tabel 11: Overzicht voornaamste menselijke β -lymfoblastoïde cellijnen en hun karakteristieken

CELLIJN	NATUURLIJKE ACTIVITEIT	TRANSFECTEERDE ACTIVITEIT	P53 STATUS
H1A1v2	CYP 1A1	CYP 1A1	Heterozygote mutant
L3	CYP 1A1	Geen	Wildtype
MCL-5	CYP 1A1	CYP 1A2 CYP 2A6 CYP 2E1 CYP 3A4 Epoxide hydrolase	Wildtype

3.2.3 Tests voor chromosoommutaties bij zoogdier- of humane cellen

Onderstaande tests worden voornamelijk uitgevoerd met humane lymfocyten. Het is echter bij elke test mogelijk andere celtypes te gebruiken afhankelijk van de doelstelling van het onderzoek. In het kader van dit project, met als doelstelling effectgericht meten van luchtstalen, kan geopteerd worden om de lymfocyten die universeel gebruikt worden te vervangen door longcellen.

3.2.3.1 Chromosoom aberratietest

Structurele chromosoom aberraties kunnen geïnduceerd worden via DNA breuken door verschillende types mutagenen. Zulke DNA breuken kunnen zich terug samenvoegen zodat het chromosoom in zijn oorspronkelijke vorm hersteld is, verkeerd terug samenvoegen, of helemaal niet terug samenvoegen. Deze laatste twee gevallen kunnen geobserveerd worden op microscoppreparaten van cellen in de metafase. Vele van deze grote veranderingen zullen geen overleving van de cel toelaten na deling, maar ze zijn wel indicatoren voor de inductie van kleinere, niet zo makkelijk observeerbare veranderingen, die wel overleving van de cel toelaten maar ernstige gevolgen kunnen hebben voor het organisme.

De chromosoom aberratie test wordt meestal uitgevoerd op menselijke perifeer bloed lymfocyten. Aangezien perifere lymfocyten zich meestal in de G0 rustfase van de celcyclus bevinden, moeten ze om metafasen te bekomen gestimuleerd worden tot deling door een specifiek antigen, zoals fytohaemaglutinine. Na 46,5 u, vlak voor fixatie (na 48 u), wordt een spoelfiguurinhibitor zoals colcemide toegevoegd om de cellen te blokkeren in de (pro)metafase van de eerste mitose.

Geïnduceerde chromosoom aberraties kunnen opgedeeld worden in twee hoofdklassen: chromosoom-type aberraties, waarin beide chromatiden van een chromosoom betrokken zijn, en chromatide-type aberraties, waarbij slechts één chromatide betrokken is. Ioniserende stralen induceren chromosoom-type aberraties (symmetrische aberraties) zoals inversies, dicentrische chromosomen en ringchromosomen, tijdens de G0 of G1 fase van de celcyclus (dus vóór replicatie); terwijl chromatide-type aberraties (asymmetrische aberraties) zoals breuken en gaps, geproduceerd worden gedurende de S of G2 fase (dus gedurende of na replicatie). De meeste chemische mutagenen zijn S-afhankelijke clastogenen en produceren dus chromatide-type aberraties.

Verschillende types aberraties kunnen onderscheiden worden:

Structurele aberraties:

- gaps
- breuken

- dicentrische chromosomen
- ringchromosomen

Numerieke aberraties: (niet adequaat door technische artefacten tijdens de spreiding)

- polyploidie (4n)
- hypodiploidie (< 46chr)
- hyperdiploidie (> 46chr)

3.2.3.2 De micronucleus test

De micronucleustest detecteert chromosoom- en genoommutaties. Een micronucleus (MN) wordt gevormd tijdens de metafase/anafase transitie van de mitose (celdeling), en kan ontstaan uit een geheel achterblijvend chromosoom (aneugene gebeurtenis die leidt tot chromosoomverlies) of een acentrisch chromosoomfragment dat loskwam van een chromosoom na een breuk (clastogene gebeurtenis) en niet integreert in de dochterkernen.

Scoren van micronuclei is relatief makkelijk uit te voeren, en op verschillende celtypes relevant voor menselijke biomonitoring: lymfocyten, fibroblasten en geëxfolieerde epitheelcellen, zonder een extra *in vitro* cultuurstap. MN geobserveerd in geëxfolieerde cellen worden niet geïnduceerd wanneer de cellen zich op het epitheeloppervlak bevinden, maar wanneer ze zich in de basale laag bevinden.

Een *ex vivo/in vitro* analyse van lymfocyten in de aanwezigheid van een actine-inhibitor, cytochalasine-B (toegevoegd 44 u na start van cultuur), laat toe een onderscheid te maken tussen mononucleaire cellen die niet deelden, en binucleaire cellen die een complete celkerndeling ondergingen gedurende *in vitro* cultuur. In deze omstandigheden verschaffen de frequenties aan mononucleaire cellen een indicatie van het background niveau aan chromosoom/genoommutaties geaccumuleerd *in vivo*. De frequenties aan binucleaire cellen met MN zijn een maat voor de schade geaccumuleerd vóór cultuur plus mutaties uitgedrukt tijdens de eerste *in vitro* mitose.

De combinatie van de micronucleustest met fluorescentie in situ hybridisatie (FISH) met een probe die de (peri-)centromerische regio van de chromosomen labelt, laat toe een onderscheid te maken tussen micronucleï die een geheel chromosoom (centromeer positieve MN) en een acentrisch chromosoomfragment (centromeer negatieve MN) bevatten.

De criteria voor selectie van binucleaire cellen voor scoring zijn als volgt:

Scor binucleaire cellen met:

- macronucleï die gescheiden zijn en van ongeveer dezelfde grootte;
- macronucleï die elkaar raken en zelfs overlappen, zolang beide nucleï duidelijk te onderscheiden zijn, en
- macronucleï die gelinkt zijn door nucleoplasmatische bruggen

Niet scoren:

- trinucleaire, quadranucleaire, en multinucleaire cellen;
- cellen waarvan de macronucleï apoptose aan het ondergaan zijn (omdat MN dan mogelijk al verdwenen of ontstaan zijn door het apoptotische proces)

In afwezigheid van cytochalasine B, worden mononucleaire cellen geanalyseerd op de aanwezigheid van micronucleï. In aanwezigheid van cytochalasine B, wordt aangeraden mononucleaire cellen te fixeren 24 u na PHA-stimulatie, aangezien er op dat ogenblik geen twijfel over kan bestaan dat MN in zulke cellen het resultaat zijn van *in vivo* en geen *in vitro* deling. Voor binucleaire cellen wordt aangeraden ze 72 u na PHA-stimulatie te fixeren. Bovendien zou 24 u na PHA-stimulatie het ideale tijdstip zijn voor het tellen van apoptotische/necrotische cellen (Kirsch-Volders et al., 2001).

Voor het scoren van micronucleï werden de volgende criteria bepaald door Fenech et al., 2003:

- De diameter van de MN moet minder dan één derde van die van de macronucleus zijn

- MN moeten gescheiden zijn van de macronucleus, of marginaal overlappen (zolang er een duidelijke identificatie van de kernen mogelijk is)
- MN moeten een gelijkaardige staining hebben als de macronuclei

3.2.4 Tests voor genoommutaties bij zoogdier- of humane cellen

3.2.4.1 De micronucleus test

Zie vorige paragraaf (idem)

3.2.5 Tests voor transformatie en inductie van het tumorale fenotype

3.2.5.1 Inleidende begrippen.

Er zijn goede redenen om aan te nemen dat kankers in hoofdzaak ontstaan uit stamcellen (Heddle, 1999; Bjerknes 1996). Uit een veelheid van gegevens blijkt duidelijk dat, naast de accumulatie van mutaties in meerdere genen (zie inleiding tot genotoxische tests), ook wijzigingen in de genexpressie een belangrijke rol spelen in de carcinogenese. Recente studies tonen aan dat verschillende environmentele carcinogenen geen genotoxische activiteit hebben. Ongeveer 20% van een groot aantal stoffen die kanker veroorzaken in knaagdieren bleken niet genotoxisch in een standaard test batterij omvattende de Ames test, de muis lymphoma test en *in vitro* cytogenetische tests (Ashby & Tennant, 1991). Sommige van deze niet-genotoxische carcinogenen veroorzaken slechts kanker in één species, één geslacht en zelfs één weefsel, en dit slechts bij hoge dosis (Choy, 2001).

Deze wijzigingen in de genexpressie kunnen plaats grijpen op het niveau van de transcriptie, op het niveau van de translatie of doorheen posttranslationale modificaties. Zij resulteren in functionele veranderingen, ondermeer m.b.t. celproliferatie, apoptose, differentiatie en celbeweeglijkheid die een belangrijke rol spelen in het verlies van een aangepast "sociaal" gedrag van de cel in weefselverband. Kanker is inderdaad een ziekte van de sociale organisatie van cellen in weefselverband en aldus een fundamentele ziekte van de meercellige organismen. Wijzigingen in zowel intercellulaire als intracellulaire signaaltransductie, die verloopt via gesecreteerde moleculen, via intracellulaire processen (waaronder phosphorylatie cascades en G proteïnen) alsook via gap-junctionele intercellulaire communicatie spelen daarbij een belangrijke rol. Een aantal gegevens wijst erop dat de verstoring van homeostatische controles doorheen verstoring van gap-junctionele intercellulaire communicatie een belangrijke rol speelt in de carcinogenese (Trosko & Ruch, 2002).

Het ontwikkelen van testsystemen die toelaten niet-genotoxische carcinogene stoffen op te sporen en te identificeren is dan ook van groot belang. Deze agentia induceren in cellen in weefselkweek dikwijls één of meerdere aspecten van het tumorale fenotype. Alhoewel het tumorale en zeker het kwaadaardige fenotype verschillende kenmerken omvatten die *in vitro* kunnen waargenomen worden zijn er echter relatief weinig test systemen ontwikkeld om niet-genotoxische kankerverwekkende invloeden te detecteren. Wel werden een aantal tests ontwikkeld om tumorale en kwaadaardige transformatie *in vitro* en inhibitie van de cel-cel communicatie te meten en te bestuderen. Inhibitie van cel-cel communicatie doorheen gap-junctions is een mechanistisch belangrijk aspect van het tumorale fenotype. In de toekomst zal het bepalen van gen-expressie profielen mogelijk toelaten de aanwezigheid van kankerverwekkende stoffen te detecteren.

3.2.5.2 Tests voor transformatie *in vitro*.

Het carcinogeneseproces kan *in vitro*, ten minste gedeeltelijk, gevolgd worden door de inductie van morfologische transformatie van cellen na te gaan (Combes et al., 1999). De verschillende stadia van de carcinogenese en de rol van oncogenen werden trouwens ontdekt middels *in vitro* studies op celtransformatie. Twee belangrijke eindpunten van celtransformatie experimenten, namelijk celophoping (focus formation) en vermogen om in zachte agar te groeien, resulteren van het verlies van contact inhibitie en verlies van substraat-afhankelijkheid ("anchorage-dependence"). Dat deze *in vitro* fenotypes wel degelijk met de carcinogenese en het verwerven van het kwaadaardig fenotype te maken hebben kan worden aangetoond door de betreffende cellen in proefdieren in te spuiten, waar deze dan kwaadaardige tumoren veroorzaken.

In dezelfde celculturen, gebruikt voor transformatie tests, kunnen ook andere eindpunten gemeten worden. Voorbeelden: genmutaties; siterchromatid exchange; chromosomale schade; inductie van micronuclei en aneuploidie. Deze informatie kan toelaten na te gaan of de transformatie berust op genotoxische of niet genotoxische mechanismen. Ook veranderingen in genexpressie, zoals over-expressie van ornithine decarboxylase, kunnen nagegaan worden.

Er bestaan drie belangrijke transformatiesystemen:

- De Syrische Gouden Hamster Embryo (SHE) cellen (in primaire cultuur)
- De muiscellijn BALB/3T3, kloon A31
- De muiscellijn C3H10T1/2

3.2.5.2.1 Transformatietests met geïmmortaliseerde muiscellijnen

Het betreft telkens fibroblast-achtige cellen die een morfologische transformatie ondergaan waarbij cellen zich gaan ophopen en hun regelmatige schikking ten opzichte van elkaar verliezen, wijzend op een verlies van inhibitie van groei en van het vermogen om zich te oriënteren in functie van contacten met andere cellen.

De muiscellijnen lenen zich gemakkelijker tot *in vitro* kweek. Het gaat echter in beide gevallen om aneuploïde cellen die reeds ten dele getransformeerd zijn in die zin dat zij reeds enkele van de wijzigingen hebben ondergaan die een rol kunnen spelen in de carcinogenese. Bovendien hebben zij een beperkt vermogen tot het metaboliseren (en activeren) van xenobiotica. Het eindpunt in deze tests bestaat in het tellen van getransformeerde foci die zich voordoen bovenop een achtergrond van in confluenta monolaag groeiende cellen. Een lange incubatieperiode van verschillende weken is noodzakelijk. In het geval van een positief resultaat wordt een significante toename vastgesteld in het aantal getransformeerde foci, dit in vergelijking met een controlecultuur. Verschillende soorten foci werden beschreven in functie van hun morfologie en kleuringskarakteristieken (Landolph, 1985).

De voordelen van het gebruik van cellijnen, in contrast met het gebruik van "normale" diploïde cellen, zijn, volgens Kakunaga, (1985), de volgende:

- 1° Een homogene populatie van doelwitcellen
- 2° Het beschikbaar zijn van een grote stock aan cellen met welbepaalde karakteristieken
- 3° Een gemakkelijk nagaan van de correlatie tussen het test-eindpunt (focus vorming) en tumorale transformatie (zie daarover Bertram, 1985 en Kuroki & Sasaki, 1985)
- 4° Het bestaan van duidelijke criteria voor het scoren van de test
- 5° Een hoge "plating efficiency"
- 6° De mogelijkheid om een eenvoudiger medium aan te wenden
- 7° Een reproduceerbare dosis-antwoord relatie

- 8° Gevoeligheid aan tumorpromoverende agentia
- 9° De inzetbaarheid in mechanistische studies.

De nadelen van het gebruik van cellijnen, in contrast met het gebruik van "normale" diploïde cellen, zijn, volgens Kakunaga, (1985), de volgende:

- 1° Men vertrekt van cellen die reeds abnormaal zijn en reeds een aantal stadia van de tumorale transformatie hebben doorlopen
- 2° Een beperkte capaciteit tot metabolisatie (en activatie) van xenobiotica
- 3° De onzekere identiteit van de cellen en het verlies van gedifferentieerde functies.

Kakunaga (1985) geeft een bespreking van deze problemen.

Volgens Schechtman (1985) is er ook een probleem met een verhoogde spontane transformatie frequentie bij gebruik van cellen uit een latere passage, en ook bij het bijhouden van de stock cultuur die steeds subconfluent moet gehouden worden

De Balb/c 3T3 test

a) Algemene informatie

De Balb/c 3T3 cellijn werd oorspronkelijk gebruikt bij de studie van de tumorale transformatie door virussen. Vertrekkend van een subkloon van deze cellijn zocht Kakunaga naar een cellijn met volgende karakteristieken.:

- 1) contact inhibitie van celgroei
- 2) sterke cel-substraat adhesie
- 3) uniforme vlakke morfologie
- 4) lage cel saturatie dichtheid (1,2 à 1,3 x 10⁴ cellen/cm²)
- 5) hoge kloning efficiëntie
- 6) relatief korte celverdubbelingstijd (ongeveer 19 u)
- 7) hoge gevoeligheid aan chemische transformatie
- 8) lage incidentie van spontane transformatie.

De door Kakunaga ontwikkelde cellijn kloon A31-714 bleek na verloop van tijd niet meer geschikt en werd vervangen door kloon A31-1 en kloon A 31-1-13.

b) Gegevens i.v.m. protocols

Het klassiek protocol voor deze test is beschreven door Schechtman, (1985b). Aanbevelingen zijn ook geformuleerd door een werkgroep van de IARC (Kakunaga & Yamasaki, 1985). Men onderscheidt type I, II en III foci. Type I foci bestaan uit een zone waarin cellen gecondenseerd (talrijker) zijn en iets sterker kleuren, maar geen cel-cel overlapping vertonen. Type I foci vormen geen tumoren *in vivo*. Type II foci bestaan uit dicht op elkaar gepakte cellen die in aanzienlijke mate opeengestapeld zijn, sterk basofiel kleuren en vertonen een relatief gladde niet-invasieve randzone. Deze foci induceren in tot ongeveer 50% van de gevallen tumoren *in vivo*. Type III foci hebben de meest afwijkende morfologie: de cellen zijn sterk gecondenseerd, sterk opeengestapeld, en missen elke gemeenschappelijke oriëntatie. Deze wanordelijke organisatie kan veelal waargenomen worden doorheen de hele focus, waarvan het aspect dikwijls koorden en knopen vertoont. Cellulaire kris-kros is dikwijls aanwezig aan de rand van de focus, met extensies die uitstralen in de omgevende gladde, contact-geïnhibeerde monolaag. Type II foci vertonen een capaciteit tot groei in zachte agar en vormen meestal (tot in 85% van de gevallen) tumoren *in vivo*. Er zijn waarnemingen die erop wijzen dat het tumorigeen vermogen van type II en type III foci niet duidelijk verschilt en dat transformerend vermogen dient gekwantificeerd te worden in functie van het totaal aantal foci van type II en III (Schechtman, 1985b).

Verschillende klonen van deze cellijn zijn ingezet geworden voor deze test. De meest gebruikte klonen zijn kloon A31-1 en kloon A-31-1-13. Deze klonen verschillen echter in aanzienlijke mate m.b.t. hun capaciteit voor endogene metabolisatie van xenobiotica, en in hun spontane transformatie frequentie, alsook in gevoeligheid aan verschillende carcinogenen. Kloon A-31-1-13 zou een endogeen promotieproces hebben, wat wellicht aan de basis ligt van de geobserveerde hoge frequentie van spontane transformatie.

Verskillende modificaties werden voorgesteld voor het testprotocol met Balb/c 3T3 cellen, onder meer inzake endogene metabole activatie.

Deze test heeft toch een aantal nadelen: 4 tot 6 weken celcultuur zijn noodzakelijk om duidelijke getransformeerde foci te kunnen waarnemen; de frequentie van transformatie is vrij laag; de test is arbeidsintensief (en dus duur).

Gegevens inzake geoptimaliseerde protocols werden gepubliceerd door Matthews (1993 a, 1993 b, 1993 c, 1993d, 1993 e) en Tsuchiya & Umeda (1995). Deze laatste stelden een nieuw protocol voor dat een aanzienlijke inkorting van de duur van de test toelaat (van 5 weken naar 3 weken), een verhoogde frequentie van transformatie, een verhoogde gevoeligheid aan verschillende types carcinogenen en een verbeterde mogelijkheid om tumorpromoverende activiteit op te detecteren.

c) Sensitiviteit en Specificiteit

Volgens Kuroki & Sasaki (1985) zou de sensitiviteit (in termen van detectie van carcinogeniciteit voor knaagdieren) van de Balb/c 3T3 test voor 104 geteste substanties 68% bedragen, en de specificiteit 67%. De Balb/c 3T3 test bleek positief voor sommige carcinogene metalen en voor aromatische amines (zie Combes et al., 1999 voor referenties). Een analyse van data voor 161 substanties bekomen met een geoptimaliseerde Balb/c 3T3 test werd gepubliceerd door Matthews et al. (1993a, 1993b, 1993c, 1993d, 1993e). Hierbij waren 84 carcinogenen en 77 niet-carcinogenen betrokken. De algemene concordantie bedroeg 71%, de sensitiviteit 80% en de specificiteit 60%.

d) Kwantitatieve gegevens inzake gebruik van de test

De term Balb/c 3T3 komt 1386 maal voor in een abstract opgenomen in Medline. De termen Balb/c 3T3 en "transformation" komen 227 maal voor in een abstract opgenomen in Medline, met 37 artikels vanaf het jaar 2000

De C3H/10T1/2 test

a) Algemene informatie

Deze test maakt gebruik van contact-geïnhibeerde fibroblasten met een lage saturatie dichtheid en een extreem lage spontane transformatie frequentie tot passage 15. De cellen worden gebruikt tussen passage 5 en passage 15. De standaard test duurt 6 weken en de resultaten zijn afhankelijk van het gebruik van gepaste loten van kalfserum. Er werd ook een protocol ontwikkeld om zowel kanker initiërende als kanker promoverende invloeden op te sporen (Landolph, 1985).

b) Gegevens i.v.m. protocols

Het klassiek protocol voor de C3H/10T1/2 test is beschreven door Landolph (1985). Aanbevelingen zijn ook geformuleerd door een werkgroep van de IARC (Kakunaga & Yamasaki, 1985). In een recente publicatie (Mitchel et al, 2004) wordt gebruik gemaakt van C3H 10T1/2 cellen (passages 9 tot 12), bekomen van Dr. J.B. Little, gekweekt in minimum essential medium (Eagle modified) met 10% foetaal kalfserum. 100 tot 300 levensvatbare cellen werden uitgeplaat in 100mm petri schalen. Het cultuurmedium werd vervangen om de 12 dagen gedurende een 7 weken durende incubatie. De cellen werden toen gefixeerd in formaline, gekleurd met Giemsa en foci type I en II werden gescoord zoals beschreven in de klassieke protocols. De monolayer is normaal zeer dun en kleurt zwak met Giemsa. De getransformeerde foci kleuren donker. Men onderscheidt type I foci, bestaande uit onregelmatige donkere vlekken in de monolaag die als niet-relevant beschouwd worden; type II foci, bestaande uit een donker kleurende ophoping van cellen, ophoping met vrij gladde randen; type III foci, bestaande uit een donker kleurende ophoping van cellen met aan de rand cellen die over mekaar liggen op een onregelmatige wijze. Getransformeerde cellijnen konden in de Scanning electronenmicroscop onderscheiden worden van niet-getransformeerde culturen op grond van de expressie van één van de volgende

morfologische kenmerken: vorming van mini- of macro-foci, (wanordelijke opstapeling van de cellen bovenop elkaar), pleiomorfisme in afmeting en vorm van cellen, en complexiteit van het celoppervlak. Er was voor elk van deze kenmerken een brede variatie tussen de verschillende getransformeerde cellijnen. Licht microscopisch was er eveneens een grote variabiliteit in termen van verschillende types van foci tussen de verschillende getransformeerde cellijnen. Met de scanning electronenmicroscopie konden cellijnen niet gekarakteriseerd worden als getransformeerd of niet getransformeerd op basis van individuele cellen. Wel konden alle getransformeerde cellijnen als dusdanig herkend worden op basis van de aanwezigheid van mini-foci.

Er zijn verschillende pogingen gedaan om de gevoeligheid van de test te verhogen. Voor metabole activatie werd beroep gedaan op rat lever S9 (Billings et al., 1985; Tu et al., 1984; Schechtman, 1985a) en ook op cocultuur met rat hepatocyten (Sivak & Tu, 1985; Tu et al., 1984). De duur van de blootstelling kan ook worden verlengd door twee sequentiële blootstellingsperiodes van 3 dagen in te lassen.

c) Sensitiviteit en Specificiteit

Volgens Kuroki & Sasaki (1985) zou de sensitiviteit (in termen van detectie van carcinogeniciteit voor knaagdieren) van de C3H/10T test voor 104 geteste substanties 81% bedragen, en de specificiteit 60%. De C3H 10T1/2 test bleek positief voor carcinogene arseen-, nikkel- en chroom-verbindingen. Het standaard protocol van deze test was echter vrij ongevoelig voor alkylerende agentia. Het gebruik van gesynchroniseerde culturen of blootstelling 5 dagen na uitplaten liet echter toe alkylerende agentia wel positief te bevinden (zie Combes et al. 1999). Over de C3H/10T test zijn minder gegevens beschikbaar dan over de Balb/c 3T3 en de SHE tests.

d) Kwantitatieve gegevens inzake gebruik van de test

De term C3H/10T komt 1233 maal voor in een abstract opgenomen in Medline. De termen C3H/10T en "transformation" komen 469 maal voor in een abstract opgenomen in Medline, met 34 artikels vanaf het jaar 2000.

3.2.5.2.2 Transformatietests met primaire celkulturen

De enige goed ontwikkelde test is hier de Syrische Gouden Hamster Embryo (SHE) test.

Syrian Hamster Embryo (SHE)

a) Algemene informatie

Het eindpunt van deze test is het tellen van celkolonies met een gewijzigde (getransformeerde) morfologie. De cellen die gebruikt worden in deze test zijn diploïed en worden aangewend binnen enkele passages na de isolatie van een gemengde populatie van embryonale cellen die in diverse stadia van differentiatie verkeren. Zulke SHE cellen hebben een beperkte life-span *in vitro* (35-50 populatie verdubbelingen) en vormen zich zelden om tot kankercellen, tenzij ze blootgesteld worden aan carcinogenen.

De eerste experimenten waarbij cellen *in vitro* een kwaadaardige transformatie ondergingen werden ongeveer 40 jaar geleden uitgevoerd met "Syrian Hamster Embryo" cellen. Deze cellen lenen zich goed voor de studie van de kwaadaardige transformatie omdat hun spontane transformatiefrequentie laag is. Cellen van een morfologisch getransformeerde kolonie evolueren significant meer frequent dan cellen van een normale kolonie naar onsterfelijkheid en kwaadaardig karakter.

In het SHE systeem gaat tumorale progressie gepaard met chromosomale wijzigingen (Isfort et al., 1996) en berust op vier genetische wijzigingen, met activatie van twee oncogenen en inactivatie van 2 tumorsuppressor genen (Boyd & Barrett, 1990).

b) Gegevens i.v.m. protocols

Het protocol voor deze test kende verschillende wijzigingen sinds de test werd voorgesteld door Berwald en Sachs (1965), de belangrijkste daarvan waren deze voorgesteld door Leboeuf et al. (1999). De klassieke standaard test voorziet in een 7 dagen durende behandeling van cellen bij clonale (lage) dichtheid bij pH 7,1-7,3 in "Dulbecco's modified Eagle's" medium met foetaal kalf serum. De kolonies worden dan gefixeerd, gekleurd en beoordeeld op transformatie. Elke celweek wordt bekeken met een stereo microscoop om het aantal kolonies per schaal te tellen. Iedere celkolonie wordt geëvalueerd als zijnde normaal of getransformeerd. Normale kolonies bestaan uit cellen in monolaag waarin de cellen ordelijk naast mekaar liggen met slechts minimale overlap van cellen, in het bijzonder daar waar de cellen confluent zijn. Aan de randen van de kolonie, waar de cellen niet confluent zijn, kunnen de cellen in alle richtingen groeien. Morfologisch getransformeerde kolonies bevatten cellen die mekaar in alle richtingen kruisen en overlappen en in drie dimensies gestapeld zijn. De cellen zijn kris-kras georiënteerd t.o.v. elkaar zowel aan de rand als in het centrum van de kolonie. Cellen in getransformeerde kolonies zijn dikwijls meer basofiel dan deze in normale kolonies (LeBoeuf and Kerckaert, 1987).

De SHE test uitgevoerd volgens het klassiek protocol stelt echter meerdere problemen waaronder een lage frequentie van transformatie, grote verschillen tussen celpreparaten (afgeleid van embryo's) en serum loten m.b.t. het bekomen van transformatie, en moeilijkheden om op een betrouwbare wijze getransformeerde van niet getransformeerde kolonies te onderscheiden. Vele wijzigingen van de standaardprocedure werden voorgesteld:

- 1° 48 uur blootstelling in massa cultuur, gevolgd door uitplaten van de cellen voor kloonvorming in medium zonder test substantie
- 2° 24 uur blootstelling aan een eerste agens, gevolgd door een blootstelling aan een tweede agens, bedoeld als test voor tumorpromotors
- 3° 24 uur blootstelling, gevolgd door een testsubstantie-vrije expressie periode om de stabiliteit van het getransformeerd fenotype na te gaan
- 4° Verversing van het medium met de test substantie 2 dagen voor fixatie om transformatie-inhiberende factoren te verwijderen
- 5° Verversing van serum factors voor expressie van het getransformeerd fenotype. Transformatie zou namelijk ook afhangen van factoren aanwezig in serum en factoren gesecreteerd door de cellen (Rivedal & Haddeland, 1996).

Het gebruik van de test bij verlaagde pH (Leboeuf et al., 1999; Kerckaert et al., 1996), biedt duidelijke voordelen. Transformatie frequenties zijn 5 à 10 maal hoger, de test is minder gevoelig aan schommelingen in de kwaliteit van het serum en aan verschillen tussen de verschillende celpreparaten en het onderscheid tussen getransformeerde en niet getransformeerde kolonies is duidelijker. Een lagere pH zou het optreden van differentiatie processen in susceptibele cellen vertragen. Belangrijke experimentele parameters die nauwlettend moeten gecontroleerd worden om betrouwbare resultaten te hebben met de SHE test (bij verlaagde pH) zijn (Kerckaert et al., 1996):

- 1° Het aantal cellen per plaat. Inderdaad, de relatieve frequentie van morfologische transformatie is functie van het aantal kolonies per plaat, wat op zijn beurt functie is van het aantal uitgezaaide cellen en van de "relative plating efficiency". Een lager aantal kolonies per plaat geeft een hogere relatieve frequentie van transformatie.
- 2° De distributie van solvent en Benzo(a)pyreen controle relatieve transformatie waarden.
Meestal bewegen positieve en negatieve controle waarden samen naar relatief hoge of relatief lage waarden.
- 3° De SHE celpreparaten

Voor ieder nieuw celpreparaat moeten het aantal uit te zaaien cellen en het potentiëel tot transformatie opnieuw bepaald worden. Voor ieder celpreparaat dient dus een reeks transformatie experimenten opgezet met negatieve controles (medium en solvent) en positieve controle (B(a)P) bij verschillende aantallen uitgezaaide cellen

per plaat (60, 80 en 100 cellen per plaat). Een gecryopreserveerd SHE celpreparaat kan 6 à 9 maanden lang gebruikt worden.

Om bruikbaar te zijn dient een preparaat aan volgende criteria te voldoen:

- a) De plating efficiënties van de onbehandelde, solvent en B(a)P groepen moet hoger liggen dan 20%, leidende tot 25-45 kolonies per plaat.
- b) De morfologische transformatie frequentie voor onbehandelde en solvent controles moet binnen de 90% spreiding van historische controle waarden liggen
- c) De morfologische transformatie frequentie voor B(a)P controle moet statistisch significant groter zijn dan deze voor de solvent controle en moet binnen de 90% spreiding van historische controle waarden liggen

4° Duur van blootstelling.

Deze omvat best zowel een blootstelling gedurende 24 uur en een blootstelling gedurende 7 dagen.

Zhang et al.(2004) stellen een kortere blootstellingsduur voor om de frequentie van transformatie te verhogen

c) Sensitiviteit en Specificiteit

Voor 472 stoffen waren standaard SHE test resultaten bekend aan Combes et al.(1999). Voor 213 van deze stoffen waren knaagdier carcinogeniciteitsdata bekend (177 carcinogene en 36 non-carcinogenen). De algemene concordantie bedroeg 80%, met een sensitiviteit van 82% en een specificiteit van 69%. De standaard SHE test voorspelde correct de carcinogeniciteit van 86% (91/106) van de carcinogenen die positief zijn in de Ames test, en van 76% (47/62) van de carcinogenen die negatief zijn in de Ames test. Aan Combes et al.(1999) waren resultaten bekend in de SHE test bij verlaagde pH voor 75 stoffen; waarvan bekend is of ze al dan niet carcinogeen zijn voor knaagdieren. De concordantie was 83%, de sensitiviteit 83% en de specificiteit 82%. Volgens Benigni & Zito (2004) heeft de SHE test, onder alle geteste systemen, één van de hoogste predictieve waarden voor carcinogene activiteit in knaagdieren, met een accuraatheid van 60 tot 65 %. Zeventien bewezen menselijke carcinogenen (IARC group I) werden allen positief bevonden in de SHE test, 15 met de standaard test en 2 met de test bij verlaagde pH.

De SHE test kan het carcinogeen vermogen van een grote variëteit aan agentia detecteren, waaronder direct werkende mutagene stoffen, stoffen die mutageen zijn na metabole activatie, epigenetische scheikundige carcinogenen, zware metalen, fijne vezels, ioniserende en ultraviolet straling, mineralen, natuurlijke producten, detergents, hormonen, extracten van uitlaatgassen en gassen die vrijkomen bij het lassen (Isfort et al., 1996). De SHE test heeft een hoge sensitiviteit voor zeer diverse scheikundige carcinogenen, waaronder zelfs stoffen die weefsel en species specificiteit vertonen. Dit zou deels kunnen verklaard worden door het feit dat de gebruikte cellen van een embryo afkomstig zijn, en dat meerdere soorten cellen en cellen in verschillende stadia van differentiatie aanwezig zijn. Ook zijn stamcellen en/of niet terminaal gedifferentieerde cellen aanwezig, cellen die wellicht een belangrijk doelwit vormen voor carcinogenese *in vivo* in tal van verschillende weefsels (Aardema et al., 1996).

d) Kwantitatieve gegevens inzake gebruik van de test

De term Syrian Hamster Embryo komt 476 maal voor in een abstract opgenomen in Medline. De woorden Syrian Hamster en "transformation" komen 398 maal voor in een abstract opgenomen in Medline, met 39 artikels vanaf het jaar 2000.

Volgens Engelhardt et al.(2004). kan de SHE test op een succesvolle manier overgedragen worden van een laboratorium met ervaring naar een ander laboratorium.

3.2.5.2.3 Transformatietests met menselijke cellen.

Menselijke cellen onderscheiden zich van cellen van de gebruikelijke proefdieren doordat ze niet spontaan aanleiding geven tot geïmmortaliseerde cellen *in vitro* en veel moeilijker te transformeren zijn (Akagi & Hanafusa, 2004). In tegenstelling tot cellen van de gebruikelijke proefdieren vertonen somatische menselijke cellen een strenge controle op de telomerase activiteit, die noodzakelijk is om te kunnen blijven delen (Newbold, 2002). Menselijke cellen verouderen en sterven af vooraleer ze de nodige genetische wijzigingen hebben ondergaan om tumoraal getransformeerd te zijn. De transformatietests met menselijke cellen maken dus gebruik van genetisch gewijzigde cellijnen die het geïmmortaliseerd fenotype verworven hebben. Twee menselijke *in vitro* transformatie modellen werden ontwikkeld, namelijk het HaCaT keratinocyt model en het MSU-1 menselijk fibroblast model

Het HaCaT model.

De HaCaT cel line werd bekomen middels spontane immortalisatie van normale menselijke keratinocyten, vermoedelijk tengevolge van mutaties in p53. Deze cellen zijn aneuploïed met specifieke chromosomale wijzigingen maar hebben de meeste fenotypische kenmerken van normale menselijke keratinocyten behouden. De cellen blijven niet-tumorigeen na lange tijd *in vitro* gekweekt te zijn. Zij kunnen aangewend worden om de effecten van carcinogenen op tumorprogressie *in vitro* te bestuderen (Combes et al., 1999).

Het MSU-1 model.

Deze cellen zijn afgeleid van v-myc-getransformeerde normale menselijke fibroblasten. Na verouderingscrisis konden geïmmortaliseerde diploïde MSU-1 cellen opgepikt worden. MSU-1.1 is een snel groeiende variant van de MSU-1 cellen, variant die 45 chromosomen telt waaronder twee merker chromosomen. MSU-1.1 cellen konden *in vitro* getransformeerd worden door een B(a)P metaboliet en door ioniserende straling en gaven aanleiding tot foci analoog aan deze in knaagdier transformatie systemen (Combes et al., 1999).

3.2.5.2.4 Enkele conclusies m.b.t. tests voor in vitro tumorale transformatie.

De menselijke *in vitro* transformatie systemen hebben nog niet het stadium bereikt waarin zij voor systematische tests bruikbaar zijn (Balls, 2004).

Inzake de noodzaak exogene enzymen voor metabole activatie te gebruiken is meer onderzoek gewenst. De standaardprocedures voor exogene metabole activatie, namelijk S9 preparaten (postmitochondriaal supernatans) en cocultuur met hepatocyten, hebben niet hetzelfde succes gekend in combinatie met *in vitro* transformatiesystemen als met mutageniciteitstests.

Van alle transformatietests is de SHE test wellicht de meest betrouwbare, en genereert weinig vals negatieve resultaten. Deze test is nu ook de meest gebruikte transformatietest. De SHE cel transformatietest, uitgevoerd onder commerciële condities volgens een "Good Laboratory Practice" protocol, met initiële toxiciteitsbepaling, selectie van dosis en blootstelling gedurende respectievelijk 24 uur en 7 dagen, kan uitgevoerd worden in een tijdspanne van 3 à 5 maanden en kost (per contract) ongeveer 40.000 Dollar. Deze kost is vergelijkbaar met de kostprijs van een kleine batterij aan genotoxiciteitstests. De test kan versneld worden door gebruik van een automatisch image analysis systeem (Ridder et al., 1997).

3.2.5.3 Weefsel-specifieke niet-genotoxische carcinogenen

Voor het opsporen van sommige specifieke soorten van niet-genotoxische carcinogenen, met een weefsel-specifiek effect, is het wellicht nodig beroep te doen op welbepaalde testsystemen zoals de MCF-7 celttest, die hormonale invloeden detecteert (Combes, 2000). Oestrogene invloeden bevorderen de proliferatie van MCF-7 cellen.

3.2.5.4 Tests voor inhibitie van cel-cel communicatie doorheen gap-junctions

3.2.5.4.1 Inleidende begrippen

Intercellulaire communicatie en Gap junctions.

Het correct functioneren van een complex organisme veronderstelt een geïntegreerd functioneren van netwerken op biochemisch, macromoleculair, cel, weefsel, orgaan, systemisch, fysiologisch, onbewust en bewust niveau. Communicatie tussen verschillende structuren en entiteiten is daarbij van cruciaal belang. Afhankelijk van de genetische achtergrond (gevoelig, resistent) en het ontwikkelingsstadium (conceptie, embryogenese, foetaal, neonataal, seksuele maturatie, geriatrisch stadium) van het levend wezen (waaronder de mens) zullen de effecten van een verstoring van de communicatie verschillend en min of meer ernstig zijn.

Men kan drie vormen van communicatie binnen een levend organisme onderscheiden. De extracellulaire communicatie is gebaseerd op signaal moleculen (ionen, neurotransmitters, hormonen) die door cellen worden vrijgesteld en kortbij of veraf gelegen cellen (hormonen) gaan beïnvloeden. Bij ontvangst van een dergelijk signaal gaat een cascade van reacties (de intracellulaire communicatie) het gedrag van de cel beïnvloeden. De GJIC is een derde vorm van cellulaire communicatie die beide vorige overlapt en de cellen toelaat ionen en moleculaire signalen uit te wisselen en te delen. Deze uitwisseling is belangrijk voor het op mekaar afstellen van het gedrag van cellen die verenigd zijn in een weefselverband. Vrij recent is men tot het inzicht gekomen dat "Gap Junction Intercellular Communication" (intercellulaire communicatie doorheen "Gap Junctions"), afgekort GJIC, een sleutelrol speelt in een levend wezen. GJIC komt tussen in de regulatie van proliferatie, differentiatie, functionele aanpassingen en apoptose. Gap junctions bestaan uit twee halve kanalen of connexons (één in elke naburige cel) die elk bestaan uit 6 connexin eiwitten. Een aantal gap junctions zijn verenigd in één klein gebied van de celmembraan tot een "gap junction plaque". Gap junctions hebben kanalen die slechts 1,5 à 2 nanometer in diameter zijn en laten slechts kleine moleculen door.

Connexin "knock-out muizen" sterven, naargelang het getroffen connexin, als embryo of fetus, of kort na de geboorte, of ontwikkelen ziekten zoals perifere neuropathy, cataract of kanker. Mutaties in één van de 20 verschillende genen coderend voor connexins leiden bij de mens tot een aantal verschillende erfelijke ziekten waaronder degeneratieve zenuwziekten, doofheid, diabetes, cataract, kanker, huidziekten en congenitale afwijkingen. Epigenetische verstoring van de GJIC door thalidomide is bij de mens geassocieerd met congenitale misvormingen.

Belang van GJIC in de carcinogenese

Een aantal gegevens wijst erop dat de verstoring van homeostatische controles doorheen verstoring van gap-junctionele intercellulaire communicatie een belangrijke rol speelt in de carcinogenese (Trosko & Ruch, 2002). Een groot aantal stoffen, waarvan bekend is dat zij als tumorpromotors werken, bleken de GJIC te verminderen. In een studie betreffende 100 mutagene of niet mutagene carcinogenen bleken nagenoeg al deze carcinogenen GJIC te inhiberen *in vivo* en/of *in vitro*. Vele oncogen-eiwitten inhiberen GJIC. Vele groeifactoren zoals EGF, PGGF, basic fibroblast growth factor en hepatic growth factor/scatter factor,

inhiberen GJIC *in vitro*. Tumorcellen vertonen meestal verminderde homologe of heterologe GJIC. Introductie van connexin genen in tumorcellen kan het fenotype van kankercellen normaliseren. In een artikel gepubliceerd in 2000 stellen Rosenkranz et al. dat inhibitie van GJIC in hoge mate geassocieerd is aan de carcinogenese (bij knaagdieren), aan cellulaire maar niet aan systemische toxiciteit, aan biologische fenomenen waarin ontstekingsprocessen een rol kunnen spelen en aan ontwikkelingsstoornissen. Aan de hand van SAR (Structuur -Activiteitsrelatie) modellen bepaalden zij van 10.000 chemische stoffen of deze stoffen positief zouden zijn m.b.t. 17 toxicologische parameters (zoals mutageniciteit in Salmonella, Ah receptor binding, permeabiliteit van de huid, carcinogeniciteit bij knaagdieren, allergische contact dermatitis, ontwikkelingsverstoring bij de mens, inhibitie van GJIC). Van alle geteste parameters was kankerverwekkend vermogen bij knaagdieren het sterkst geassocieerd aan inhibitie van GJIC ($p < 0.00001$). Ook ontwikkelingsverstoring bij hamsters en capaciteit om doorheen de huid te dringen bleken zeer sterk geassocieerd met inhibitie van GJIC. Het detecteren van biologische activiteit die erin bestaat GJIC te inhiberen lijkt, in het licht van al het bovenstaande, een bijzonder belangrijke en relevante parameter

3.2.5.4.2 Een test voor studie van GJIC

a) Protocol

Het testen van een substantie of extract op inhibitie van GJIC is bovendien relatief eenvoudig. Prof James Trosko heeft na een persoonlijk contact gedetailleerde informatie doorgezonden en verwees naar een recente publicatie van zijn hand. Een geschikte test bestaat in het meten van GJIC in WB-F344 rat lever epitheliale cellen middels de "scrape-load-dye transfer assay". Cellen worden gekweekt in een 24-well plaat en gedurende korte tijd (30 minuten) of langere tijd (tot 48 uur) blootgesteld. De cellen worden tweemaal gewassen met PBS, een fluorescente kleurstof (lucifer yellow, 0,05%w/v in PBS wordt toegevoegd, en de cellaag wordt verwond met een scalpel. Gedurende 2 minuten wordt diffusie langs de GJIC toegelaten en dan worden de cellen gewassen met PBS en gefixeerd met 4% formaldehyde. De afstand waarover de kleurstof doorheen de cellen diffundeert wordt vergeleken in behandelde en controle kulturen. .

b) Kwantitatieve gegevens i.v.m.het gebruik van de test.

De term GJIC komt 484 maal voor in een abstract opgenomen in Medline, met 237 artikels vanaf het jaar 2000

3.2.5.5 Tests gebaseerd op gen-expressie profielen

Het effect van toxische stoffen op de expressie van genen is reeds met succes gemeten zowel *in vitro* (Waring et al., 2001) als *ex vivo* (Hamadeh et al., 2002; Waring et al., 2003). Het is wellicht zo dat alle kankerverwekkende stoffen, zowel de genotoxische als de niet-genotoxische, effecten hebben op de genexpressie. Er zijn testsystemen ter beschikking met zowel prokaryote als eukaryote cellijnen, Pro-tox en Cat-tox die ondermeer toegepast werden voor evaluatie van toxiciteit van zuivere stoffen, en mengsels van deze stoffen (Dardenne et al., mededeling Setac 2004).

De onderzoeksgroep van de professoren Kleinjans en van Delft, die deel uitmaakt van het Steunpunt Milieu en Gezondheid, heeft zeer recent aangetoond dat het mogelijk is genotoxische van niet-genotoxische carcinogenen te onderscheiden op basis van hun effect op de expressie van een vrij beperkt aantal genen. Zij kwamen tot deze vaststelling middels een reeks DNA-microarray-experimenten waarbij 597 menselijke, hoofdzakelijk toxicologisch relevante genen, werden gebruikt. De toxicologisch relevante genen omvatten processen waarvan het belang voor de chemische carcinogenese bekend is zoals apoptose (caspases, BAK, Bax, Fas, cyclins, TNFs), de controle van de celcyclus cel (cyclins, DNA binding

proteïns, Waf 1), celproliferatie (kinases, transcriptiefactoren, groeifactoren and receptoren, connexins), DNA schade en herstel (DNA herstel enzymen, ERCCs, GADDs, helicasen, topoisomerasen), inflammatie (serumamyloïdes, interleukines, adhesiemoleculen, chemokines), metabolisme (CYP450s, glucuronidatie enzymen, glutathion enzymen, methyltransferases, redox enzymen), oxidatieve stress (O₂ response enzymen, superoxide dismutase, redox enzymen), peroxisome proliferatie (peroxisomale enzymen), transport (multidrug resistente proteïnen, organische anion and kation transporters) en cel-weefsel interacties (connexines, integrines, selectines, cadherines).

Het meten van de genexpressie middels DNA microarray experimenten is echter een vrij complexe zaak waarbij vele geavanceerde moleculair-biologische technieken te pas komen. Bovendien moet men beschikken over dure apparatuur. Voor de analyse van de resultaten moet beroep gedaan worden op complexe statistische methoden middels gespecialiseerde software.

Vooraleer deze beloftevolle benadering zal kunnen ingezet worden voor routine detectie en klassificatie van kankerverwekkende invloeden zal nog veel onderzoek noodzakelijk zijn. Veel meer chemische stoffen, waaronder ook niet-carcinogene agentia, zullen moeten onderzocht worden in termen van effecten op de genexpressie, dit om relevante profielen te definiëren, en bijkomende informatie over effecten van blootstellingsduur, dosis-antwoord, reproduceerbaarheid en best geschikte celsystemen zal moeten ingewonnen worden. Ook zal het prijskaartje verbonden aan sommige van de benodigde technieken moeten dalen vooraleer een inzet in effectgerichte monitoring op milieustalen kan overwogen worden.

4 HEMATOTOXICITEIT

4.1 Het bloedvormend systeem als targetorgaan

Bloedcellen worden blootgesteld aan elke stof die in de bloedbaan terecht komt, ook al worden deze snel gemetaboliseerd of uitgescheiden. Daarenboven is beenmerg een stockageplaats voor tal van lipofiele stoffen. Deze blootstelling heeft in het slechtste geval als gevolg schade aan bloedcellen en beenmerg verstoringen vb verminderde afweer, overgevoelighedsreacties (allergie), neutropenie , leukemie, anemie....

Hematotoxiciteit is de studie van schadelijke effecten op bloed en bloedvormende organen als een doelwitorgaan voor medicatie, omgevingsstoffen, chemische stoffen in de werkplaats en factoren zoals stress, fysieke inspanning en ioniserende straling.

Opmerking: het bloedvormend systeem heeft een zeer groot aanpassingsvermogen. Zeker het aantal stam- en progenitorcellen kan sterk dalen vooraleer er meetbare effecten zijn op de output van rijpe bloedcellen. De relatie tussen effecten van chronische blootstelling aan polluenten en het effect van polluenten op delingscapaciteit van progenitorcellen is niet éénduidig.

4.2 Opbouw van het immuun- en bloedvormend systeem

Rijpe bloedcellen hebben een beperkte levensduur. Ze worden continu vervangen doordat primitieve stamcellen prolifereren en differentiëren tot mature, functionele cellen. Bij de bloedcelvorming worden uit de stamcellen in het beenmerg via allerlei tussenstadia de witte en rode bloedcellen gevormd. Deze productie wordt samengevat onder de term hemopoëse. Het beenmerg is het belangrijkste bloedvormend orgaan in de mens. Beenmerg is uiterst complex weefsel waar zich ontelbare cel-cel interacties afspelen. Deze interacties zijn nodig voor de gebalanceerde aanmaak van verschillende bloedcellen en de regulatie van celmigratie tussen beenmerg en bloed en omgekeerd. Daarnaast spelen cytokines, chemokines en adhesiemoleculen een rol bij de hemopoëse.

Het bloedvormend systeem is hiërarchisch opgebouwd. De bloedcellen kunnen in drie grote compartimenten met een verschillend ontwikkelingsstadium onderverdeeld worden:

- 1) De primitieve *pluripotente stamcellen* hebben de eigenschap om via proliferatie nieuwe stamcellen te vormen en zo zichzelf in stand te houden. Ze kunnen ook via gelijktijdige proliferatie en differentiatie aanleiding geven tot nieuwe rijpe cellen. Een pluripotente stamcel kan in verschillende celreeksen differentiëren en aanleiding geven tot alle klassen van bloedcellen bv lymfocyten (lymfopoiëse), witte bloedcellen (myelopoiëse), rode bloedcellen (erythropoiëse), bloedplaatjes (thrombocytopoiëse). De nieuwvorming van cellen houdt gelijke tred met het verdwijnen van mature cellen.
- 2) De *unipotente stamcellen* of progenitoren zijn reeds verder gedifferentieerd en zijn beperkt in hun proliferatie- en differentiatiecapaciteiten. Ze kunnen slechts differentiëren tot een welbepaalde klasse van bloedcellen (vb granulocyten);
- 3) De *rijpe bloedcellen* hebben elk hun typische morfologische en functionele eigenschappen (vb macrofagen, rode bloedcellen, lymfocyten,...). (Tabel 12)

Tabel 12: De verschillende bloedcellen en hun functie

Bloedcel	Functie
Witte bloedcellen lymfocyten granulocyten macrofagen	afweer
Rode bloedcellen	zuurstof transport
Megakaryocyten	bloedstolling
Dendritische cellen	antigen presentatie (allergie)

4.3 *In vitro* tests

Stamcellen en progenitoren zijn morfologisch niet herkenbaar. Bovendien is hun aantal vrij laag. Het aantal van deze cellen kan echter bepaald worden via *in vitro* weefselkweek technieken. Deze methode bestaat erin de stamcellen te stimuleren tot deling in een halfvaste voedingsbodem. Afhankelijk van de keuze van de toegevoegde cytokines zullen de cellen delen en differentiëren in een bepaalde richting. De dochtercellen vormen een kolonie (Tabel 13).

Zo zal het enten van een heterogene beenmerg celsuspensie op een halfvaste voedingsbodem voorzien van de nodige groeifactoren tot gevolg hebben dat de unipotente granulocyt-macrofaag progenitorcellen differentiëren tot herkenbare kolonies van granulocyten en/of macrofagen. Men noemt ze CFU-GM: Colony Forming Units of granulocytes and/or macrophages. Het aantal kolonies is een maat voor het aantal progenitoren/stamcellen. Ook effecten op de proliferatie en het differentiatieproces kunnen via deze tests bestudeerd worden. Deze test werd gevalideerd door Ecvam.

COLONY FORMING UNIT-GRANULOCYTE/MACROPHAGE (CFU-GM) ASSAY

De hematotoxiciteit van xenobiotica wordt bepaald aan de hand van de inhibitie van groei van CFU-GM.

INVITTOX Protocol n^o: 101

Tabel 13: Overzicht van de kolonievormende technieken (Colony Forming Assays)

Naam	Bloedceltype in de kolonie
CFU-GM	granulocyten en/of macrofagen (witte bloedcellen)
CFU-M	macrofagen
CFU-G	granulocyten
BFU-E	erythrocyten (rode bloedcellen)
CFU-MK	megakaryocyten (bloedplaatjes)
CFU-GEMM	granulocyten, erythrocyten, macrofagen en megakaryocyten

5 Immuno-respiratoire toxiciteit

5.1 Immunotoxiciteit

Zoals in hoofdstuk 1 aangegeven van dit rapport, speelt het immuunsysteem een belangrijke rol in omgevingsziekten zoals astma en allergie. Het immuunsysteem omvat niet één orgaan maar is een complex cellulair systeem dat uit verschillende lymfoïde organen bestaat. De basis van het immuunsysteem wordt gevormd door lymfocyten. Deze cellen kunnen recirculeren. Daarnaast nestelen de lymfocyten zich in de lymfoïde organen. De belangrijkste lymfoïde organen zijn de milt, lymfeklieren en het lymfoïd weefsel dat geassocieerd is met bijvoorbeeld de darm en de longen. Ten slotte worden lymfocyten ook aangetroffen in de thymus en beenmerg. In deze laatste ontstaan lymfocyten vanuit hun voorlopercellen. Naast de verschillende lymfoïde celtypes spelen ook niet-lymfoïde cellen zoals macrofagen, natural killer (NK) cellen, eosinofielen, basofielen, epitheelcellen en dendritische cellen een belangrijke rol in het immuunsysteem.

Het immuunsysteem is een samenspel van verschillende celtypes en hun producten zoals cytokines en antistoffen. Het immuunsysteem behoort tot de vijf meest gevoelige orgaan-systemen voor chronische blootstelling aan lage dosissen chemicaliën. De belangrijkste stoornissen zijn op basis van hun aard in drie groepen in te delen: bij immunodeficiënties heeft het immuunsysteem een te geringe werking; bij auto-immuunziekten keert het immuunsysteem zich tegen het eigen lichaam; en bij allergische (overgevoeligheds)reacties reageert het immuunsysteem te sterk op een onschuldige uitwendige agens.

Wanneer pathogenen de eerste fysische/(bio)chemische barrières (mucosa, epitheel, maagzuur,...) in het lichaam hebben overwonnen, wordt het immuunsysteem gealarmeerd. Het biedt een tweede (niet-specifieke) en derde (specifieke) verdedigingslinie tegen binnendringende micro-organismen en toxische stoffen (zie tabel 14). De aard van de afweerreactie wordt mede bepaald door de plaats waar lichaamsvreemde stoffen zijn binnengedrongen. Lichaamsvreemde stoffen kunnen het lichaam via drie verschillende routes binnendringen: via de huid of longen, systemisch (via bloed) en via het spijsverteringskanaal.

Tabel 14: Overzicht van verschillende systemen van afweer.

	<i>Niet-specifiek</i>	<i>specifiek</i>
Oppervlak (huid, ...)	Mechanische barrière Secretoire barrière trilhaarbeweging	
Humorale afweer	Lysozym Lactoferrine Complementsysteem Fibronectine interleukinen	immunoglobulinen
Cellulaire afweer	Fagocyterende cellen: -Mononucleaire fagocyten -granulocyten NK-cellen	T-lymfocyten macrofagen dendritische cellen

De humorale afweer bestaat uit een aantal niet-specifieke componenten die met micro-organismen een interactie kunnen aangaan. Interactie tussen het specifieke afweersysteem

en lichaamsvreemde stoffen of micro-organismen (antigenen) leidt tot de vorming van antistoffen.

De epithelia (van de huid, long, darm) worden continu blootgesteld aan allerlei antigenen. Enerzijds vormen de bedekkende epithelia een mechanische en fysiologische barrière tegen binnendringende antigenen, anderzijds zijn deze epithelia in staat antigenen op te nemen. Antigeen-presenterende cellen (macrofagen, dendritische cellen) spelen een hoofdrol bij de verwerking van het antigeen. Antigeen-presenterende cellen (APC) nemen antigenen op en degraderen deze tot oligo-peptiden. Deze peptiden worden gebonden aan HLA-klasse II-moleculen (HLA antigenen zijn histocompatibiliteitsantigenen) en op de celmembraan gepresenteerd. T-helpercellen die een antigeen receptor (TcR) dragen zullen hieraan binden wat leidt tot activatie en proliferatie van de T-cel. Hierbij worden allerlei genen tot expressie gebracht (o.a. cytokines). De volgende stap is de activatie van de B-cel waardoor de antistofsynthese op gang wordt gebracht. T-cellen worden enkel, geactiveerd als de APC ook de geschikte costimulatorische moleculen uitdrukken. Indien enkel de TcR bindt op de HLA in afwezigheid van een costimulatorisch signaal, leidt dit tot anergie of apoptosis van de T-cel in kwestie en dus inhibitie van een immuun antwoord.

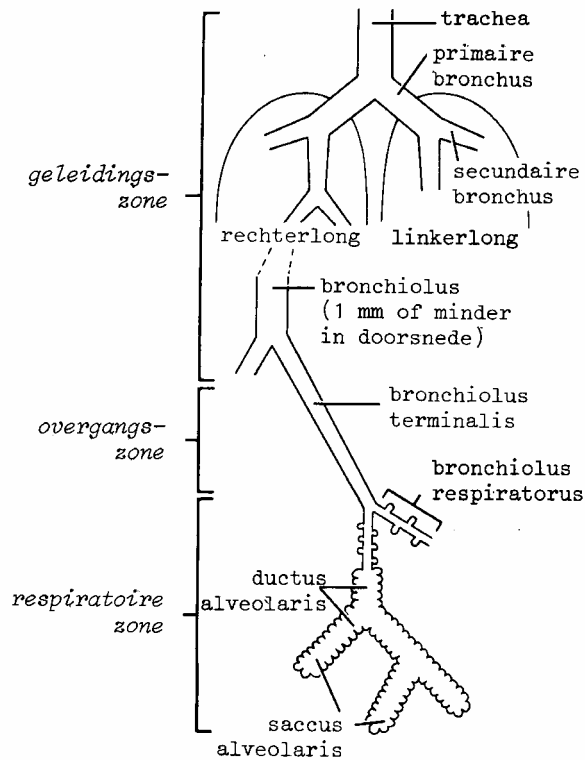
De cellulaire afweer is te onderscheiden in een niet-specifiek deel (de fagocyterende cellen en NK-cellen) en de specifieke afweer. Granulocyten en mononucleaire fagocyten (macrofagen en hun voorloper cellen) fagocyteren en kunnen intracellulair micro-organismen doden. Granulocyten gaan in dit proces vaak ten gronde. Mononucleaire fagocyten zijn belangrijke secretoire cellen. De NK-cellen kunnen cellen die met virus geïnfecteerd zijn en tumorcellen doden zonder voorafgaande sensibilisatie. In de specifieke cellulaire afweer worden cytotoxische T-cellen geproduceerd na antigeenpresentatie aan T-lymfocyten en worden mononucleaire fagocyten geactiveerd.

5.2 Immuno-Respiratoire toxiciteit

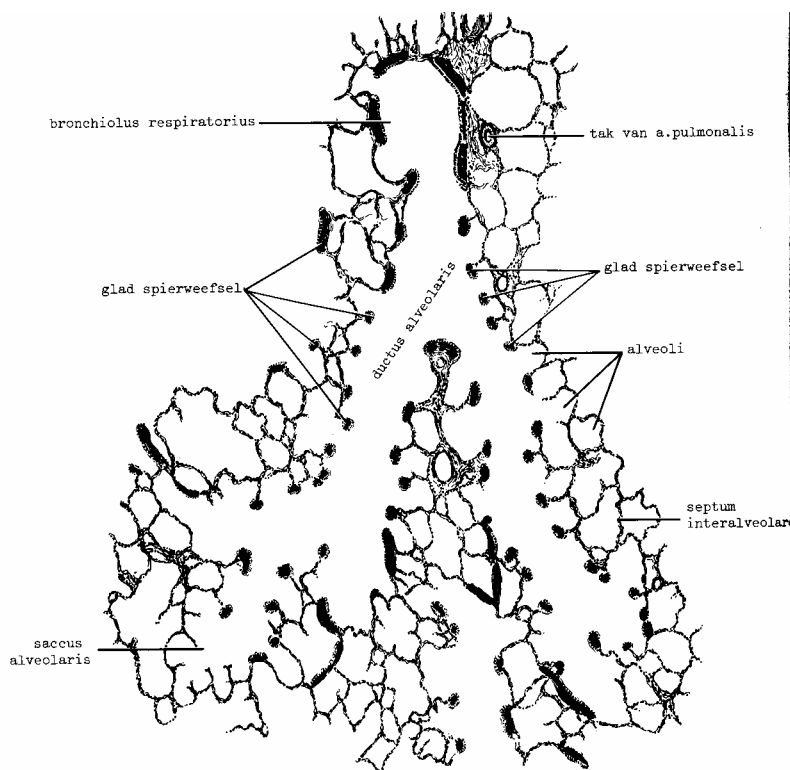
Het respiratoir systeem heeft verschillende functies. Naast olfactorische, gasuitwisseling en bloeioxygenatie functies, heeft het ook een **beschermende rol tegen xenobiotica en invaderende micro-organismen**. De respiratoire tractus is dus niet alleen maar een passieve en/of actieve fysische barrière met mucociliaire clearance, maar speelt een significante rol in zowel de **niet-specifieke als specifieke immuun surveillance**. De mogelijkheid van de respiratoire tractus om deze verschillende functies uit te oefenen is afhankelijk van de aanwezigheid van een vasculair, lymfatisch en zenuwnetwerk en van de aanwezigheid van verschillende celtypen met verschillende functies.

Respiratoire toxiciteit wordt gedefinieerd als ongunstige effecten op de structuur of werking van het respiratoir systeem door blootstelling aan chemische substanties. Respiratoir toxische stoffen kunnen een variëteit van acute en chronische pulmonaire symptomen teweegbrengen, zoals lokale irritatie, bronchitis, astma, chronische obstructieve longziekten (pulmonair oedeem, emfyseem) en kanker. (zie hoofdstuk 1)

Het ademhalingsstelsel wordt gewoonlijk in twee delen onderscheiden. Het *geleidende deel* bestaat uit de neusholte, nasofarynx, larynx, trachea, bronchi, bronchioli en bronchioli terminales. Het *respiratorische deel* wordt gevormd door de bronchioli respiratorii, de ductuli alveolares en de hierop aansluitende sacculi alveolares. Uitwisseling van gassen tussen bloed en ingeademde lucht vindt plaats in de alveoli, die het grootste deel van het longvolume in beslag nemen (zie figuur 3 en 4).



Figuur 3: De belangrijkste zones van het ademhalingssysteem. Voor de duidelijkheid zijn de ruimtelijke verhoudingen sterk veranderd. (Junquera en Carneiro, 1981)

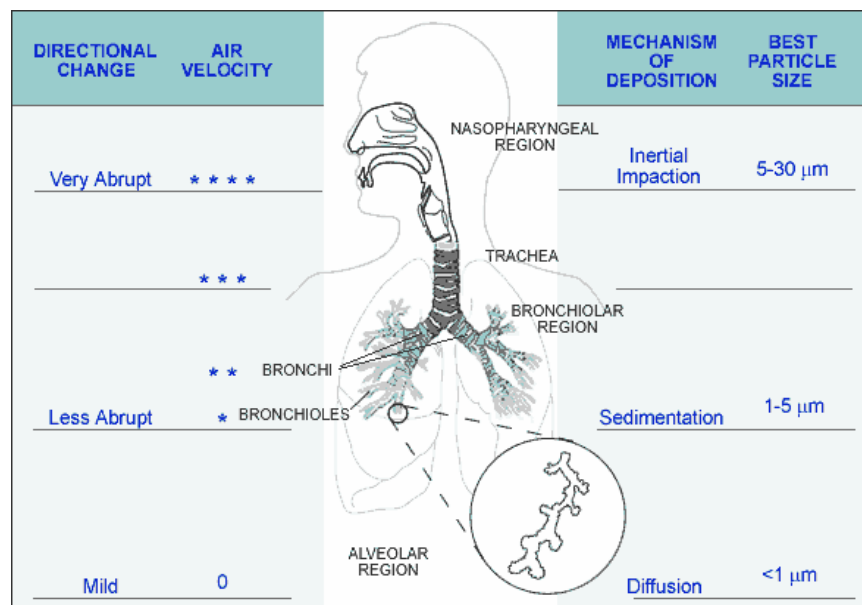


Figuur 4: Schematische tekening van een terminaal gedeelte van de bronchiale boom. (Junquera en Carneiro, 1981)

De humane long is het grootste orgaan van ons lichaam met een oppervlakte van 40 – 120 m² en zorgt voor de uitwisseling van gassen. Om deze uitwisseling te kunnen garanderen, moeten de longen in nauw contact staan met de omgeving. De lucht die we inademen bevat niet alleen gassen zoals zuurstof en koolstofdioxide, maar ook een aantal biologische en niet-biologische partikels, meestal onzichtbaar voor het blote oog. Het **defensiemechanisme van de long** kan onderverdeeld worden in drie geïntegreerde systemen. De specifieke anatomie van de luchtwegen zorgt voor een “mechanische” verdediging door het conditioneren en zuiveren van de lucht als deze de luchtwegen passeert. Als reactie op lichaamsvreemd materiaal ontstaat een niet-specifieke ontstekingsrespons gemedieerd door verschillende celtypes (macrofagen, epitheelcellen en granulocyten). Tenslotte beschikt de long ook over specifieke immuun responsen als reactie op micro-organismen of vreemde stoffen.

5.2.1 Anatomie van de luchtwegen: Mechanische afweer

De long is meestal in staat om een groot aantal partikels die zich neerzetten in de longen te elimineren. De grotere partikels kunnen niet diep geïnhaleerd worden in de longen. Ze worden tegengehouden door fijne haren en mucus in de neus, keel en grotere luchtwegen (trachea en bronchi) en door mucociliaire klaring opwaarts gestuwd in de keel en tenslotte uit het lichaam verwijderd door niezen, hoesten of inslikken. Kleinere partikels, kleiner dan 10 µm in diameter zijn meer geneigd om de bovenste luchtwegen te passeren en in de diepere zuurstofabsorberende delen van de longen te penetreren. Ultrafijne partikels met een aërodynamische diameter van 2.5 µm of minder (PM_{2,5}), zoals deze in dieseluitlaat, vormen een ernstig probleem voor de volksgezondheid omdat ze via de neus en keel tot het diepste van de longen (alveoli) kunnen penetreren (figuur 5).



Figuur 5: Depositie van partikels in de long

De gezonde long is dus in staat zich te beschermen tegen een groot aantal partikels die zich neerzetten op z'n oppervlak, maar deze defensiemechanismen kunnen verstoord worden door een te groot aantal partikels of door de toxiciteit van partikels. Hierdoor neemt de fagocytotische capaciteit af en dit resulteert in een verlengde retentie in de long en een toegenomen interactie met epitheliale en andere cellen. Bij patiënten met een defecte

mucociliaire klaring of abnormale immuunfunctie is zelfs een klein aantal partikels voldoende om schadelijke effecten te veroorzaken aan de longen (Salvi et al., 1999).

5.2.2 Fagocytose en niet-specifieke ontsteking

De alveolaire macrofagen vormen de eerstelijnsdefensie. Deze cellen fagocyteren vreemd materiaal waarna het wordt vernietigd of verwijderd uit de luchtwegen maar produceren ook signaalmoleculen (cytokines) die andere cellen aantrekken en/of activeren om zo een ontstekingsreactie op gang te brengen.

Passeert een micro-organisme/partikel bovengenoemde barrière dan kunnen deze ook in contact komen met onder andere alveolaire epitheelcellen (type I en II). De alveolaire epitheelcellen zijn, naast de macrofagen, de eerste targetcellen voor partikelinteractie en depositie, en zijn daarom de cellen die getroffen worden door de toxische effecten van de partikels (Salvi et al., 1999). Type II alveolaire epitheelcellen spelen een sleutelrol in de controle van de immuun- en ontstekingsreactie in de alveolaire ruimte (Crestani et al., 1998). Pulmonaire dendritische cellen (DC) vormen een dicht netwerk in de verschillende compartimenten van de longen. We vinden ze terug tussen de epitheliale cellen van de mucosa, in het perivascular en peribronchiolair losmazig bindweefsel, de alveolaire septa, de pleura en de longcapillairen van het longparenchym (Semper et al., 1996; Nicod et al., 2000; Lipscomb et al., 2002). Deze cellen produceren immuunregulerende moleculen en zijn ook belangrijk bij de specifieke immuunrespons door de presentatie van allergenen aan T-lymfocyten (von Bubnoff et al., 2002).

Andere cellen die een rol spelen bij de niet-specifieke afweer zijn oa granulocyten, NK-cellen, monoccyten, eosinofielen, T en B lymfocyten.

5.2.3 Specifieke immuunrespons:

In de long kunnen twee types van specifieke immuunrespons opgewekt. De eerste is de antimicrobiële immuun respons via IgM en IgG productie en cytotoxische Tc lymfocyten. De tweede vorm is de allergische IgE-gemedieerde immuunreactie.

5.3 Kandidaattests voor screenen van immuno-respiratoire toxiciteit

Immunotoxiciteitstesting wordt momenteel uitgevoerd in de context van algemene toxiciteit volgens OECD guideline 407. Deze richtlijn omvat voornamelijk proefdier tests (oa histopathologie, differentiële bloedcel tellingen en beenmerg cellulariteit).

Er zijn een aantal erkende immunologische *in vitro* tests beschreven (ECVAM, INVITTOX) voor irritatie (huid en oog) en sensitisatie. (zie bijlage) Daarnaast zijn er een aantal tests beschreven in de literatuur die gebruikt worden om veranderingen aan het immuunsysteem in te schatten. In deze tests wordt voornamelijk gebruik gemaakt van de functionele respons van immuuncellen. Tests voor cellulaire immuniteit (vb. macrofaag fagocytose, cytokine productie) en sensitisatie kunnen ook toegepast worden in het kader van respiratoire toxiciteit door gebruik te maken van immuun-gerelateerde eigenschappen van relevante luchtwegcellen.

5.3.1 *In vitro* tests opgenomen in ECVAM, INVITTOX database

5.3.1.1 *Immunotoxiciteit*

POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES LOCOMOTION

Chemotaxis en 'at random' migratie van polymorfe nucleaire leukocyten worden gemeten in aanwezigheid van toxische teststoffen. Een verandering van de chemotaxische index is een aanwijzing van cytotoxiciteit van chemicaliën.

INVITTOX. Protocol n°: 12

5.3.1.2 *Huidirritatie*

Zie bijlage 2.

5.3.1.3 *Oogirritatie*

Zie bijlage 2.

5.3.1.4 *Huidsensitisatie*

Zie bijlage 2.

5.3.1.5 *Respiratoire toxiciteit*

DUST TOXICITY IN RAT ALVEOLAR MACROPHAGE CULTURES

Macrofagen in cultuur kunnen blootgesteld worden aan particulier materiaal. De resulterende toxische effecten kunnen gemeten worden. Er zijn tests voor overleving van cellen met behulp van vitale kleurstoffen of enzymale tests.

INVITTOX. Protocol n°: 32

5.3.2 *Andere in vitro* tests

5.3.2.1 *Tests voor cellulaire immuniteit*

Proliferatie van lymfocyten na stimulatie met niet-specifieke mitogenen (PHA, LPS)

Eindpunt: -proliferatie index

Mixed lymfocyt reactie (MLR) test

Eindpunten:

- proliferatie van lymfocyten na stimulatie met allogene cellen
- productie van TH1/TH2 cytokines: il-4, il-5, il-10, il-12, IFN- γ

NK cel functie

Eindpunt: NK activiteit: percentage lysis van tumor cellen

Macrofaag activiteit

Eindpunt: fagocytose

5.3.2.2 Tests voor humorale immuniteit

B-cel lijn (2C4/F3)

Eindpunt: IgE productie

T-cell afhankelijke antibody respons op schaap rode bloedcellen

Basofiel test

5.3.2.3 Tests voor dermale hypersensitiviteit

In vitro kweek van dendritische cellen

Eindpunten:

- membraanmarker expressie: CD80, CD86, HLA-DR
- cytokine productie
- expressie van chemokines, adhesiemoleculen

5.3.2.4 Tests voor respiratoire toxiciteit

De luchtwegen zijn door hun complexiteit moeilijk om *in vitro* te evalueren. Hieronder zullen de relevante luchtwegcellen en specifieke eindpunten beschreven worden, die kunnen bijdragen aan een *in vitro* test voor respiratoire toxiciteit. Een variëteit van eindpunten zijn geschikt voor pulmonaire cytotoxiciteit, inflammatie en irritatie. Een samenvattende tabel is terug te vinden in bijlage 2.

5.3.2.4.1 Bronchi

Elke primaire bronchus vertakt zich dichotoom 9 tot 12 maal, waarbij elke volgende vertakking geleidelijk kleiner wordt tot een diameter van ongeveer 1 millimeter is bereikt. Het epitheel is pseudomeerlagig gecillieerd met slijmbekercellen. De lamina propria van de bronchi is rijk aan elastische vezels en bevat vele seromuceuze klieren. In het losmazig bindweefsel van de lamina propria komen veel lymfocyten voor, die op sommige plaatsen follikels vormen. Tussen de spierbundels bevindt zich verder een venenplexus, die betekenis heeft bij de verdere verwarming van de ingeademde lucht. In de wand van de bronchi gaan de kraakbeenringen over in onregelmatige platen.

De bronchiale epitheelcellen kunnen gerepresenteerd worden door cellijnen (Calu-3 en Beas-2B) en primaire cellen (normal human bronchial epithelial cells (NHBE) en normal human small airway epithelial cells (SAEC)). De epitheelcellen van trachea en bronchi zijn zeer bruikbaar voor de studie van de ciliogenese en ciliair herstel. Andere eindpunten zijn: celproliferatie, genotoxiciteit, carcinogenese, celtransformatie, biochemische samenstelling van de celmembraan, expressie van receptoren zoals klasse I en II MHC antigenen, celadhesiemoleculen en adrenoreceptoren, de vrijstelling van mediators zoals cytokines en arachidonzuur, en de productie van reactieve zuurstofdeeltjes. Cellulaire elektrofysiologische eigenschappen en ionentransport worden ook bestudeerd.

Cellijnen:

Calu-3:

Calu-3 is een humane bronchiale epitheliale cellijn, afkomstig van een bronchiaal adenocarcinoom van de long, met morfologische karakteristieken van een sereuze cel van de tracheobronchiale klier, maar vertoont ook karakteristieken kenmerkend voor slijmbekercellen of mucoze kliercellen, zoals secretorische granules en expressie van mucusgenen. Het is een adherente cellijn en vormt monolagen (met tight junctions) in cultuur.

Studies op humane bronchiale epitheliale cellijnen zijn vooral gericht naar fysiologische processen van het luchtwegepitheel (bijvoorbeeld voor de studie van de pulmonaire route van geneesmiddelentransport of iontransport ed.), en de karakterisatie van hun celbiologie. Er is ook interesse in hun gebruik naar pathofysiologische studies, zoals de respons van het epitheel op schade en inflammatoire mediators.

Humane bronchiale epitheel cellijn: Calu-3

Eindpunten:

- fysiologische processen o.a. iontransport (Na⁺), K⁺, (Cl⁻)
- cel karakterisatie
- schaderespons
- productie van inflammatoire markers

Beas-2B:

Beas-2B is een humane bronchiale epitheliale adherente cellijn, afkomstig van normaal humaan bronchiaal epitheel, maar geïnfecteerd met adenovirus 12-SV40 hybride en gekloneerd. Deze cellijn brengt keratines en SV40 T antigen tot expressie. De cellen behouden de mogelijkheid om squameuze differentiatie te ondergaan als respons op serum.

De Beas-2B cellijn worden reeds gebruikt voor studies rond luchtvervuiling (vooral ozonblootstelling en omgevingspartikels), waarbij men bijvoorbeeld gaat kijken naar genotoxiciteit a.d.h.v. zusterchromatide-uitwisselingen, maar ook de productie van IL-6, IL-8 en GM-CSF worden onderzocht. Een aantal artikels vermelden het gebruik van de Beas-2B cellijn tezamen met andere cellen om zo een cocultuur te vormen. De cellijn is ook geschikt om bijvoorbeeld de cytotoxiciteit van metalen, zoals chroom en mangaan, na te gaan (MTT-assay). Een ander interessante toepassing in relatie tot respiratoire toxiciteit is de blootstelling van Beas-2B cellijn aan een respiratoir sensitiserende stof, toluen diisocyaan (TDI) met als eindpunt IL-8 productie.

Humane bronchiale epitheel cellijn: Beas-2B

Eindpunten:

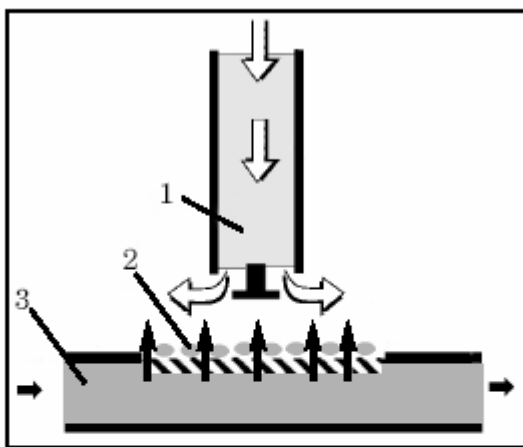
- schaderespons: cytotoxiciteit
- procollageen type I en III productie
- TGFβ1, TGFβ2, il-8, il-6, PDGF productie
- activatie van NF-κB
- expressie adhesie moleculen : ICAM-1

HFBE 21:

Deze humane foetale bronchiale epitheelcellijn werd gebruikt in een experimenteel apparaat (Cultex^R) (Figuur 7), opgebouwd uit een rookmachine, een verdunningsapparaat voor de rook, analytische onderdelen voor online monitoring en een speciaal aangepaste blootstellingsmodule, voor de validatie van een *in vitro* testsysteem voor complexe omgevingsstalen, opgebouwd uit zowel gassubstanties als partikels. De cellen worden gegroeid op microporeuze membranen en blootgesteld aan rook van twee verschillende

types sigarettenrook om zo de sensitiviteit en specificiteit van het systeem na te gaan. Als eindpunt meet men de totale glutathioninhoud en de intracellulaire ATP/ADP inhoud van de cellen en bepaalt men de celviabiliteit door meting van de tetrazoliumzout reductie en het aantal cellen aanwezig. Het systeem biedt nieuwe wegen om natieve complexe gassen en aërosolmengsels *in vitro* te testen.

Een ander blootstellingsysteem (Figuur 6) maakt ook gebruik van deze cellijn en hierbij worden de cellen direct blootgesteld ter hoogte van de lucht/vloeistof interfase. Het blootstellingapparaat is klein en flexibel genoeg om geconnecteerd te worden met een variëteit van aërosol-genererende systemen, zonder de noodzaak van een incubator, omdat het voorziet in alle benodigdheden om celviabiliteit te behouden over een welbepaalde periode. Dit systeem kan ook gebruikt worden om complexe gasmengsels en omgevingsstalen te testen, bijvoorbeeld dieseluitlaat en sigarettenrook. Als eindpunten kijkt men naar glutathion inhoud en de intracellulaire ATP/ADP inhoud van de cellen en bepaalt men de celviabiliteit door meting van de tetrazolium zout reductie.



1. *Exposure gas flow conducted very close to the cells.*
2. *Human lung cells, cultivated on microporous membranes (0.4µm pore size) exposed apically directly without medium coverage and basally nutrified and humidified by culture medium under the membranes by capillary forces and evaporation.*
3. *Culture medium supply.*

Figuur 6: *systeem voor blootstelling van cellen aan gasfase (Aufderheide et al, 2002)*

Primaire cellen:

Normal human bronchial/tracheal epithelial cells (NHBE):

De normale humane bronchiale/tracheale epitheliale cellen zijn een voorbeeld van primaire cellen en kunnen aangekocht worden bij de firma Cambrex (Verviers, België).

De cellen worden gebruikt in kankeronderzoek, maar ook voor respiratoire ziekten en de studie van cellulaire functie en differentiatie.

Normal human small airway epithelial cells (SAEC):

Deze primaire cellen zijn kleine luchtweg epitheliale cellen, eveneens te koop bij de firma Cambrex. Deze cellen worden gebruikt in onderzoek naar astma, inhalatietoxicologie en pulmonaire inflammatoire responsen.

Humane primaire bronchiale epitheelcellen

Eindpunten:

- inflammatoire responsen: NO, IL-8, TNF- α , IFN- γ en IL-1 β , GM-CSF

5.3.2.4.2 Bronchioli

Na een aantal vertakkingen van de bronchi komt men terecht in de bronchioli. Een opvallend kenmerk van de bronchioli is de afwezigheid van kraakbeen en klieren. Naast trilhaardragende cellen komen in het epitheel van de bronchioli nog opvallende, heldere cellen voor zonder trilharen, de zogenaamde *Clara-cellen*. Deze cellen hebben zowel een ruw als glad endoplasmatisch reticulum, een golgicomplex, mitochondriën. Clara-cellen tonen de hoogste graad van cytochroom P450-gemedieerd metabolisme in vergelijking met ander pulmonaire celtypes en één van hun belangrijkste functie is de metabolisatie van airborne xenobiotica. Het zijn belangrijke targetcellen voor elke toxische, mutagene of carcinogene component, welke bioactivatie vereisen via het cytochroom P450 systeem. Men heeft een aantal vermoedelijke functies van Clara-cellen gedefinieerd, zoals bijdrage tot de vorming van surfactant of eliminatie van het surfactant, bescherming tegen het schadelijk effect van geïnhaleerde toxinen en carcinogenen (oxidasefunctie), een bescherming tegen emfyseem (antiproteasefunctie). Clara-cellen wordt ook beschouwd als een mogelijke stamcel waaruit de andere soorten bronchiolaire epitheelcellen worden gevormd.

Clara-cellen produceren ook het Clara-cel proteïne (CC16). Dit is een recente nieuwe benadering voor de beoordeling van effecten op luchtwegen door luchtpolluenten ed. De aanwezigheid van CC16 in humaan serum is een biomarker voor toxische gebeurtenissen in de respiratoire tractus. CC16 geeft een beeld van het aantal of de integriteit van de Clara-cellen in bronchioli. CC16 in serum is daarom een niet-invasieve manier om verstoring van de longepitheelbarrière te detecteren. CC16 speelt ook een protectieve rol bij intrapulmonaire inflammatoire processen, oxidatieve schade en fibrose.

Deze cellen produceren naast CC proteïnen ook long surfactant geassocieerde proteïnen (SP-A en SP-B). De belangrijkste functie van SP-eiwitten is het verminderen van de oppervlaktespanning tussen lucht en bloed in de alveoli en daardoor zullen de alveoli niet dichtklappen. SP-A en SP-B zijn ook potentiële biomarkers voor respiratoire toxiciteit en zijn reeds waargenomen in uitgeademde lucht.

Cellijnen:

Er zijn bij ATCC een aantal cellijnen te koop (CRL-5807, CRL-5819, HTB-174) met dezelfde cytoplasmatische structuren als de Clara-cellen.

Primaire cellen:

Clara cellen kunnen worden geïsoleerd uit de long.

Bronchiale epitheel cellen: Clara cellen

Eindpunten:

- eiwit secretie: CC16, CC10
- surfactant eiwit secretie: SP-A; SP-B, SP-C; SP-D
- proteoglycans productie

5.3.2.4.3 Alveoli

Elke bronchiolus terminalis splitst zich in een aantal bronchioli respiratorii, die de overgang vormen van het *geleidende deel* naar het *respiratorische deel*. Het respiratoire deel is opgebouwd uit de bronchioli respiratorii, ductuli alveolares, sacculi alveolares en uiteindelijk de alveoli. Alveoli zijn zakvormige uitstulpingen waarvan één wand ontbreekt. Door de wand van deze structuren met een diameter van ongeveer 200 micrometer vindt de uitwisseling van zuurstof en koolstofdioxide plaats tussen de alveolus en het bloed. Tegen elkaar liggende alveolen zijn gescheiden door een interalveolair septum. Een dergelijk tussenschotje is opgebouwd uit twee lagen van dun epitheel dat de alveoli bekleedt en

daartussen een interstitium, bestaande uit een netwerk van collageen en elastische vezels, die steun verlenen aan de alveoli en waarin capillairen zijn ingebed. In dit interstitium komen verschillende celtypen voor, zoals: endotheelcellen, alveolaire dekcellen, septale cellen, alveolaire macrofagen, fibrocyten, leukocyten, contractiele cellen, dendritische cellen enz...

De *alveolaire dekcellen*, ook wel pneumocyten van het type 1 genoemd, vormen een barrière van minimale dikte, die toch nog goed doorlaatbaar is voor gassen. Morfologisch zijn er pinocytoseblaasjes aanwezig in het cytoplasma. Deze blaasjes spelen een voorname rol bij de afvoer van surfactant en verwijdering van kleine verontreinigingen uit de alveolaire ruimte. De alveolaire cellen type I vertonen geen mitosen, dit wil dus zeggen dat deze cellen gevormd worden uit een ander celtype, namelijk de alveolaire cellen van het type II.

De *grote alveolaire cellen*, ook wel pneumocyten type II of septale cellen genoemd, komen verspreid voor tussen de alveolaire dekcellen en kunnen wel mitosen ondergaan, hetgeen bij regeneratie een rol speelt. Hierbij kunnen alveolaire dekcellen uit grote alveolaire cellen ontstaan, hetgeen wijst op hun nauwe verwantschap. Cytologisch lijken de grote alveolaire cellen op secretorische cellen met talrijke mitochondria, ruw endoplasmatisch reticulum, een goed ontwikkeld Golgi-apparaat en een oppervlak dat dicht bezet is met microvilli. In histologische coupes hebben deze cellen een karakteristiek blazig of meer schuimig cytoplasma. De vacuolen bevatten opvallende lamellaire lichaampjes. Histochemisch onderzoek heeft aan het licht gebracht dat deze lichaampjes die vooral fosfolipiden, maar ook glycoproteïnen en eiwitten (SP-A, SP-B, SP-C, SP-D) bevatten, continu worden aangemaakt en door exocytose op het celoppervlak worden geledigd. Het materiaal uit de lamellaire lichaampjes wordt over het oppervlak van de alveolaire bekleding uitgespreid, waarbij een extra-cellulaire vloeistoffilm ontstaat, de surfactant, die van groot belang is voor de longfunctie. Deze cel heeft dus, in tegenstelling tot de alveolaire dekcel, een hoge metabole activiteit.

Alveolaire macrofagen zijn afkomstig van monocyten uit het bloed en behoren tot het mononucleair fagocytensysteem. Het zijn grote polymorfe cellen met een uitgebreid lysosomaal apparaat, die tegen de alveolaire bekleding liggen en zich hier overheen bewegen. Vele met koolstofpartikels of stofdeeltjes beladen macrofagen die men in het bindweefsel rond de bloedvaten of in de pleura aantreft, hebben nooit in de alveolaire ruimte verkeerd. Deze macrofagen van het longbindweefsel, ook wel *interstitiële macrofagen* genoemd, vormen een aparte categorie van de alveolaire macrofagen. 'Beladen' alveolaire macrofagen die uit de alveolaire ruimte afkomstig zijn, kunnen door luchtbewegingen naar het geleidende deel worden getransporteerd en vandaar ook weer door luchtstoten, al dan niet met medewerking van het trilhaarapparaat, naar buiten worden gebracht.

Pulmonaire dendritische cellen vormen een dicht netwerk in de verschillende compartimenten van de longen. We vinden ze terug tussen de epitheliale cellen van de mucosa, in het perivascular en peribronchiolair losmazig bindweefsel, de alveolaire septa, de pleura en de longcapillairen van het longparenchym. Dendritische cellen in luchtwegepitheel brengen een immatuur fenotype tot expressie en kennen een snelle turnover. Dendritische cellen in de alveolaire septa en losmazig bindweefsel hebben een meer matuur fenotype en in de vasculaire compartimenten van de longen zijn circulerende precursor-DC aanwezig.

- *Epitheel cellen*

Cellijnen:

A549:

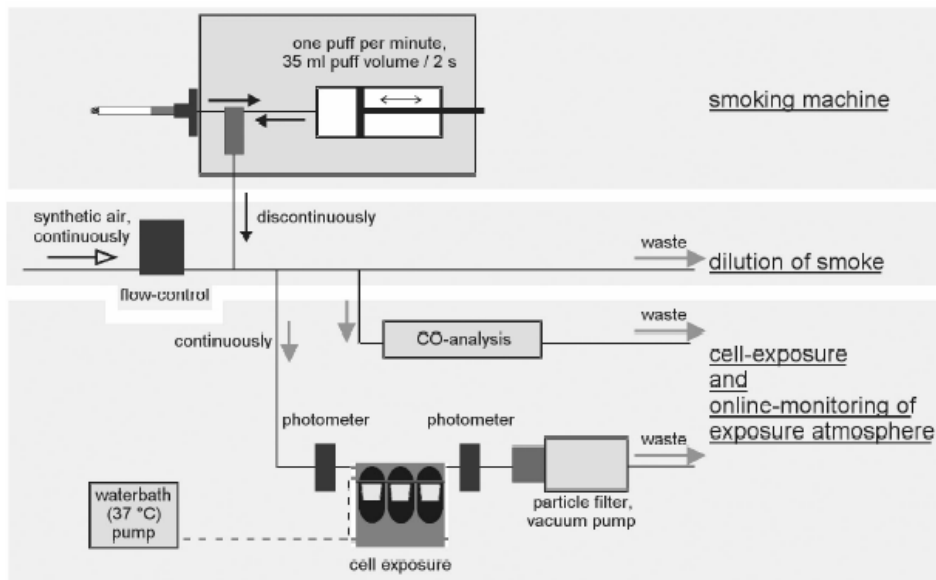
De A549 cellijn is een humane alveolaire adherente epitheelcellijn van het type II, afkomstig van een longcarcinoom. De cellen brengen een aantal receptoren tot expressie, zoals thromboxaan A2, A1-klasse adenosine receptor en muscarine cholinerge receptor, en produceren ook keratine en lecithine.

Deze cellijn wordt frequent gebruikt in onderzoek te doen naar luchtweginflammatie. Humaan luchtwegepitheel gedraagt zich als een fysische barrière tegen externe stimuli en speelt een

belangrijke rol in de regulatie van luchtweginflammatie door productie van cytokines, chemokines en expressie van celoppervlakte adhesiemoleculen, welke bijdragen aan de rekrutering van effectorcellen.

Naast toepassing voor luchtweginflammatie kan de cellijn ook gebruikt worden voor de studie van mechanismen betrokken in: signaaltransductieregulatie die een rol spelen in inflammatoire processen (oa NF- κ B, AP-1), en oxidatieve stress responsen.

De A549 cellijn werd evenals de foetale bronchiale epitheliale cellen (HFBE) gebruikt in het verbeterd *in vitro* systeem Cultex^R (Figuur 8) voor het testen van complexe mengsels, zoals sigarettenrook, dieselemisssies.



Figuur 7: systeem van blootstelling van A549 cellen op microporeuze membraan aan rook. (Aufderheide et al, 2003)

Humane alveolaire epitheelcellijn type II: A549

Eindpunten:

- schaderespons: cytotoxiciteit
- signaaltransductie: NF- κ B activiteit, AP-1 expressie
- cytokine productie: TGF β 1
- pro-inflammatoire cytokine productie: il-6, il-1, TNF- α
- adhesiemolecule ICAM-1
- chemokineproductie: MCP-1, il-8
- oxidatieve stress: glutathion, ROS

- Macrofagen en monocyten

Cellijnen:

THP-1:

THP-1 is een humane monocytcellijn, afkomstig van perifeer bloed van een persoon met acute monocyttaire leukemie. Het zijn ronde cellen in suspensie en vormen soms clusters. Deze cellijn kan gedifferentieerd worden tot *macrofagen* door toevoeging van phorbol myristate acetate (PMA).

De cellijn werd reeds gebruikt voor onderzoek naar effecten van luchtpolluenten zoals DEP, ozon, omgevingspartikels, roet.

THP-1 zijn ook kandidaat cellen voor een *in vitro* model voor contactsensitisatie. Hierbij wordt de THP-1 cellijn aanschouwd als een antigeen-presenterende cel en vervanger van

primaire dendritische cellen. Er wordt in deze studies gekeken naar fenotypische veranderingen (oa CD86, HLA-DR expressie als indicator voor activatie van THP-1 cellen) als predictief eindpunt voor contactsensitiserende stoffen.

Humane monocyt cellijn: THP-1

Eindpunten:

- schaderespons: cytotoxiciteit
- fenotype: membraanmerkers expressie CD86, HLA-DR, CD54 (ICAM-1), CD80
- cytokine productie: il-1 β , TNF- α , il-6

U937:

De suspensiecellijn U937 is een humane monocytcellijn, afkomstig van kwaadaardige cellen van de pleurale effusie van een patiënt met diffuus histiocytair lymfoom, en kan gedifferentieerd worden tot macrofagen door toevoeging van supernatans van humane mixed lymfocyt culturen, forbolesters, vitamine D3, gamma interferon, TNF en retinoïnezuur. De cellen produceren een aantal cellulaire producten, zoals lysozyme, IL-1, GM-CSF, IL-10, IL-6, IL-8, ECEF, VPF, LBIF, ...

Humane monocyt cellijn: U-937

Eindpunten:

- schaderespons: cytotoxiciteit
- cytokine productie: il-1 α , il-1 β , il-8, il-10, TNF- α

RAW 264.7 en Mono Mac 6

Deze monocyt/macrofaag cellijnen zijn afkomstig van de muis en kunnen worden aangekocht bij ATCC.

Muis macrofaag cellijn: RAW 264.7

Eindpunten:

- schaderespons: LDH vrijstelling
- vrijstelling archidonzuur (precursor van prostaglandine en leukotrienes)
- cytokine productie: il-6

Primaire cellen:

Perifeer bloed monocyten/macrofagen:

Monocyten kunnen worden geïsoleerd uit perifeer bloed via adherentie of door gebruik te maken van specifieke antilichamen. Na kleuring kunnen de positieve cellen worden geïsoleerd via magnetische sortering of via flowcytometrie.

Humane primaire monocyten:

Eindpunten:

- Cytokine/chemokine productie: il-6, il-8, TNF- α , MIP-1 α
- fenotype: membraanmerkers expressie CD86, HLA-DR

- Dendritische cellen

De dendritische cellen zijn zeer belangrijk bij de inductie van allergieën en astma. Deze cellen bevinden zich in weefsels die in nauw contact staan met de uitwendige omgeving zoals bv. in de longen, huid, darm. Het zijn de meest krachtige antigeen-presenterende cellen van het menselijk immuunsysteem.

Cellijnen:

MUTZ-3:

MUTZ-3 is een humane acute myelomonocytaire leukemie cellijn. MUTZ-3 is een equivalent van CD34⁺ DC precursoren en fungeert als een vervanging voor deze primaire culturen. MUTZ-3 zien er morfologisch uit als ronde blastachtige cellen, soms in kleine clumps aanwezig.

Recent wordt onderzocht of deze cellijn geschikt is als een *in vitro* model voor contactsensitisatie van chemische allergenen.

Humane acute myelomonocytaire leukemie cellijn: MUTZ-3

Eindpunten:

- fenotypering: CD1a, CD14, CD34, CD83 en HLA-DR
- cytokine/chemokine productie: MCP-1 en IL-8.

KG-1:

KG-1, afkomstig van een beenmergaspiraats van een persoon met erythroleukemie dat zich ontwikkelt tot acute myelogene leukemie, is een potentieel model voor immature myeloïde dendritische cellen en deze cellen kunnen verder geactiveerd worden door verschillende stimuli tot mature myeloïde dendritische cellen. De cellen groeien in suspensie.

De cellijn kent reeds een aantal toepassingen. De KG-1 cellijn wordt ook gebruikt om de intracellulaire signalen betrokken bij de differentiatie van CD34⁺ hematopoïetische stamcellen tot dendritische cellen te bestuderen. Daarnaast bestudeert men ook fenotypische veranderingen (HLA-DR, CD54, CD80, D86) na blootstelling aan chemische allergenen DNFB, MCI/MI, het irritant SDS, LPS en TNF- α .

Humane acute myeloïde leukemie cellijn: KG-1

Eindpunten:

- fenotypering
- cytokine/ chemokine productie: MCP-1

Primaire cellen:

CD34-afgeleide en monocyt-afgeleide dendritische cellen

Deze cellen worden gebruikt als *in vitro* model voor het opsporen van sensitiserende stoffen. Om *in vitro* DC te verkrijgen, vertrekkende van ongedifferentieerde progenitorcellen, kan men vertrekken van twee verschillende celpopulaties: CD14⁺-cellen en CD34⁺-cellen. CD34 is een typische merker voor primitieve stamcellen, die kunnen uitgroeien tot alle mogelijke celreeksen, afhankelijk van met welke groeifactoren deze cellen in contact komen. CD14⁺-cellen zijn al meer ontwikkelde cellen en kunnen slechts tot enkele celpopulaties uitgroeien in aanwezigheid van specifieke groeifactoren (monocyten en macrofagen). CD14⁺-cellen vertegenwoordigen een groot percentage van het totaal aantal cellen in navelstrengbloed, perifere bloed en beenmerg, en dit in tegenstelling tot de CD34⁺ subpopulatie. Deze laatste kan men voornamelijk uit navelstrengbloed en beenmerg isoleren en ook daar komen ze in lage percentages voor (0.1 – 0.5% en 0.5 – 3% respectievelijk). Onafhankelijk van in welk percentage dat de cellen voorkomen, kan men deze specifieke celpopulaties in een grote zuiverheid bekomen door gebruik te maken van magnetische celsortering (MACS). Deze twee populaties worden in kweek gebracht en door de geschikte groeifactoren toe te voegen bekomt men een populatie van immature DC.

Deze cellen kunnen dan blootgesteld worden aan teststoffen (respiratoire-, contact sensitiserende en irriterende stoffen) en als eindpunten wordt gekeken naar cytokineproductie (ELISA), fenotype (flowcytometer) en genexpressie (micro-array).

Humane dendritische cellen

Eindpunten:

- fenotypering: CD80, CD83, CD86,....

- cytokine productie: il-6, il-12
- chemokine productie
- T-cel stimulatie

6 REPRODUCTIETOXICITEIT

6.1 Algemeen

Het eindpunt reproductietoxiciteit verwijst naar schadelijke effecten door stoffen die op één of andere manier aangrijpen in de cascade van cellulaire, biochemische en fysiologische processen die de reproductiecyclus onderhouden. Het betreft enerzijds de processen die bij mannelijke en vrouwelijke organismen instaan voor een succesvolle voortplanting (fertiliteit), en anderzijds de ontwikkeling van nakomelingen (Boekelheide et al., 1997). Een aantal van de reproductieprocessen staan onder controle van het endocriene systeem, hetgeen afzonderlijk als eindpunt (zie volgende deel) besproken zal worden.

Er zijn een aantal gevalideerde tests voorgeschreven in internationale richtlijnen (bv. OECD) waarbij aspecten als fertiliteit, embryotoxiciteit, teratogeniciteit bij zoogdieren geëvalueerd wordt. Tot hertoe betreft het echter allemaal "*in vivo*" tests. Enkele van deze tests zijn in herziening (draft) of nieuwe testprotocols zijn in ontwikkeling en/of validatiefase. Het toepassingsgebied van deze tests wordt via internationale organisaties als bijvoorbeeld het ICH¹, een internationale organisatie voor harmonisatie van tests voor farmaceutische producten of via EU-directieven gedefinieerd (ICH, 2004).

• OECD 407 (draft)	Enhanced 28-Day repeated dose oral toxicity
• OECD TG 414:	Developmental Toxicity Study
• OECD TG 415:	One-Generation Reproduction Toxicity Study
• OECD TG 416:	Two-Generation Reproduction Toxicity Study
• OECD TG 421:	Reproduction/Developmental Toxicity Screening Study
• OECD TG 422:	Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Study
• OECD 426 (draft):	Developmental Neurotoxicity Study
• OECD Draft:	Uterotrophic Bioassay for (anti) estrogenic effects
• OECD Draft:	Herschberger Bioassay for (anti) androgenic effects

• ICH S5A:	Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products (Segment I, II and III studies)
• ICH S5B:	Reproductive Toxicology: Male Fertility Studies

Directive 67/548/EEC:	
○ B. 31 (=OECD 414)	Teratogenicity test – rodent and non-rodent, additional Annex VIII species for chemicals produced more than 1000t/a (Level 2 testing)
○ Testing,	Study for peri-natal and post natal effects for level 2 testing
○ B. 34:	(OECD TG 415) one-generation reproduction toxicity test
○ B.35:	(OECD TG416) Two-generation reproduction toxicity test
○ Extended B.35	
○ B.22 (= OECD TG 478)	rodent dominant lethal test (Annex VII A, B, C)
○ B.23 (=OECD TG 483)	mammalian spermatogonial chromosome test

¹ International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) is a unique project that brings together the regulatory authorities of Europe, Japan and the United States and experts from the pharmaceutical industry in the three regions to discuss scientific and technical aspects of product registration (<http://www.ich.org>).

Vanuit ethisch oogpunt zijn er een aantal initiatieven lopende (ECVAM², ICCVAM³, EU 6^{de} KP) om alternatieve tests voor reproductietoxiciteit te ontwikkelen en te valideren. Het zijn ofwel *in vivo* niet-zoogdier tests om teratogene effecten te bestuderen zoals de FETAX-test en de ELS-test, beiden om teratogene effecten op te sporen. FETAX (frog embryo teratogenesis assay-Xenopus) en ELS (early life stage fish test-zebrafish) worden als screeningsassays beschouwd om potentieel humaan teratogene stoffen op te sporen. Verder zijn er nog *in vitro* tests met zoogdiercellen (primaire cellen, of cellijnen) die in een stapsgewijze benadering (Tiered-level approach) aanbevolen worden als screeningstests voor effecten op reproductie. Vanwege de complexiteit van het systeem is het duidelijk dat schadelijke effecten op dit targetsysteem niet door één *in vitro* test beschreven kan worden (Spielmann, 1998; Piersma, 2004). Het betreft een batterij van *in vitro* tests die potentieel kandidaat zijn voor een screening van effecten door blootstelling aan pollutanten die zich via luchtpollutie verspreiden. Aangezien het aantal tests die via officiële organisaties een wetenschappelijke validatie gepasseerd zijn, erg beperkt is, zullen we ook hierna toelichting geven bij tests in ontwikkeling. Bruikbaarheid en toepasbaarheid voor milieustalen zal later, zoals voor elk van de verschillende eindpunten of targetsystemen, in een afzonderlijk deel geëvalueerd en bediscussieerd worden.

6.2 Eindpunten en kandidaatstests voor screening van reproductietoxiciteit

6.2.1 Fertiliteit

Toxische effecten met impact op fertiliteit kunnen bij mannelijke en vrouwelijke organismen belangrijk zijn. Het betreft de verschillende processen van respectievelijk spermatogenese en folliculogenese. De targetcellen in het mannelijke systeem zijn de rijpe spermatozoa, Leydig cellen en Sertoli cellen. Er zijn voor functionele studies en voor oncologisch onderzoek diverse testiculaire cellijnen ontwikkeld, namelijk voor Leydig en Sertoli cellen van de muis (Rahman & Huhtaniemi, 2004). Toepassingen voor toxicologisch onderzoek lijken beperkt.

Bij het vrouwelijke voortplantingssysteem worden effecten bij meiotisch competente eicellen geëvalueerd of bij de granulosa cellen. Een voorbeeld van testsysteem is de verzameling van oöcyten van ovaria van runderen in het slachthuis. Maturatie, *in vitro* fertilisatie en blastocyst ontwikkeling worden gescoord bij blootstelling aan toxische stoffen, zoals PCB's (Krogenaes et al., 1998).

Voor elk van voorgaande testsystemen is het onderzoek echter nog in volle ontwikkeling. De evaluatie van eindpunten betreft zowel morfologische als functionele aspecten. Dit zijn enerzijds celgroei en differentiatie, anderzijds aanmaak of expressie van hormoonreceptoren, productie van steroïden of andere functionele eiwitten. De testsystemen zijn echter nog niet in die mate gevalideerd dat ze op routinematige basis kunnen gebruikt worden voor screening van milieupolluenten.

6.2.2 Implantatie

Voor een succesvolle implantatie van het embryo zijn de functionaliteit van het endometrium (baarmoederweefsel) en de aanleg van de placenta cruciale processen. Er zijn nog geen gevalideerde *in vitro* testsystemen ter beschikking om deze eindpunten te evalueren. Enkele testsystemen waarvoor selectie en evaluatie van geschikte eindpunten met het oog op de

² ECVAM: is het Europese Centrum voor validatie van alternatieve methoden in Ispra, Italië. (<http://ecvam.jrc.it/index.htm>).

³ ICCVAM: The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (<http://iccvam.niehs.nih.gov/home.htm>)

ontwikkeling van een gevalideerde test nog in onderzoeksfase zijn, zijn ondermeer de volgende:

- Endometrium functie en trofoblast cellen
- Placenta toxiciteit (perfusie systeem).

6.2.3 Embryotoxiciteit

Sinds 1980 wordt er gewerkt rond alternatieve methoden voor embryotoxiciteit, met hetzij celculturen of orgaansystemen in aanleg. De meest complexe tests zijn geïsoleerde post-implantatie embryo's (knaagdieren) die in cultuur gehouden worden tijdens de periode van organogenese om toxische effecten op te sporen (Eisenbrand et al., 2002; Piersma, 2004). Voor 3 types van testsystemen, met toenemende graad van complexiteit, is de validatie momenteel het meest gevorderd en zijn er internationaal protocols ter beschikking. Vergelijking van 3 testtypes voor 20 teststoffen toonde 100% voorspelbaarheid voor typisch embryotoxische stoffen. De geselecteerde tests behoorden tot één van de volgende groepen.

6.2.3.1 Test met embryonale stamcellen (EST):

Embryonic stem cell test for embryotoxicity (ECVAM, 2004)

Date of the ESAC statement: 01 May 2002

Links: INVITTOX Protocol, ESAC Statement

Deze testsystemen die gebruik maken van een continue cellijn zijn minst onderhevig aan ethische bezwaren maar hebben ook de beperking dat ze als geïsoleerd systeem de verschillende mechanismen van ontwikkeling niet kunnen benaderen. Deze embryonale stamcellen laten toe om individuele mechanismen, als celproliferatie, celadhesie, celdifferentiatie en metabole interacties te evalueren. Behalve van muizen, zijn er ook van vis, kip, konijn, rund, schaap en recent ook menselijke embryonale stamcellen ter beschikking. De embryonale stamcellen hebben 2 belangrijke voordelen voor specifiek farmacologische studies, nl. a) het pluripotente karakter om te differentiëren tot ectoderm, mesoderm of endoderm en b) het gemak voor toepassing van genetische manipulatie (Gorba & Allsopp, 2003). Voor specifiek toxicologische studies is er de embryonale stamceltest (EST), afgeleid van zowel muizen als humane cellen, die in een pre-validatiestudie als succesvol werd beschouwd (Scholz et al., 1999). Voor een selectie van teststoffen werden 3 eindpunten bestudeerd: inhibitie van contractie van gedifferentieerde hartspier, cytotoxiciteit van stamcellen, en vergelijkende cytotoxiciteit van 3T3-fibroblasten.

6.2.3.2 Test met primair materiaal voor orgaanaanleg

Micromass embryotoxicity assay (ECVAM, 2004)

Date of the ESAC statement: 01 May 2002

Links: INVITTOX Protocol, ESAC Statement

Deze testsystemen maken gebruik van embryonaal primair materiaal van zoogdieren. Er is vooral ervaring met weefsel voor aanleg van de ledematen of de hersenen. Met hoge dichtheid celculturen van embryonale aanleg van ledematen wordt de invloed van xenobiotica op differentiatie van kraakbeen geëvalueerd. In preparaten met embryonaal hersenweefsel wordt de differentiatie van het zenuwstelsel bestudeerd.

6.2.3.3 Test met volledige embryo's

Dit type testsn ondervindt ethische bezwaren. Anderzijds biedt dit voordelen aangezien de volledige embryonale ontwikkeling van celproliferatie tot celdifferentiatie en de onderlinge interacties tussen orgaansystemen in totaliteit bestudeerd worden. Er zijn daarom ook op lagere organismale niveaus (lager dan zoogdieren) tests ontwikkeld voor bijvoorbeeld de poliep (Hydra), kikker (FETAX), vis en kip. Het model met post-implantatie embryo bij knaagdieren werd tot hertoe het meest bestudeerd (Piersma, 2004) en maakte deel uit van een internationale validatiestudie. Deze systemen komen niet in aanmerking voor huidige studie en worden daarom niet verder belicht in dit hoofdstuk.

7 ENDOCRIENE TOXICITEIT

7.1 Algemeen

Het endocrien systeem omvat belangrijke mechanismen die het lichaam heeft om informatie over te dragen tussen cellen en weefsels, door gebruik te maken van zgn signaalstoffen of hormonen. Dit resulteert in de regulatie van een ganse reeks fysiologische processen zoals energietoevoer, groei, voortplanting etc. Met betrekking tot deze laatste functie is er een overlap met het hoofdstuk 'reproductietoxiciteit'.

De problematiek rond endocriene toxiciteit heeft de laatste 10-tal jaren aan belang gewonnen nadat vastgesteld werd dat zeer diverse milieupolluenten zich kunnen gedragen als bijvoorbeeld het vrouwelijke hormoon, 17 β -oestradiol en bij blootstelling de functie van het endogene hormoon kunnen nabootsen en/of verstoren. De signalisatiefunctie van hormonen impliceert de aanwezigheid van receptoren, plaatsen op de celwand of in de cel waarop het hormoon (of de pollutant) zich bindt.

Er zijn in het kader van deze problematiek vooral biologische methoden ontwikkeld die toelaten op basis van receptorbinding (voor oestrogenen, androgenen,...) of via activatie van getransformeerde cellen met reportersystemen, hormoonverstorende pollutanten te detecteren. Als gevolg van een relatief eenvoudige structuur van steroïden, en hun lipofiel karakter kunnen exogene chemicaliën (farmaceutische stoffen, milieu –en voedselcontaminanten) met de verschillende pathways van hormoonregeling interfereren. Steroidhormonen zullen na diffusie doorheen de celmembraan hun werking uitoefenen na binding op intracellulaire receptoren (Zacharewski , 1998).

Binnen Vito is er voor dit type van tests onderzoek in uitvoering met toepassingen voor diverse milieumatrices. Het betreft enerzijds tests die via de oestrogen of androgen receptor werken en anderzijds wordt de synthese van steroidhormonen in diverse types van celcultuursystemen geëvalueerd (zie tabel 8). Via literatuurstudie, nationale en internationale contacten (bijv. EDSTAC⁴) zullen beschikbare tests geëvalueerd worden voor relevantie en bruikbaarheid. Het overzicht van kandidaattests (*in vitro* en *in vivo*) volgens EDSTAC wordt in onderstaande kader weergegeven (figuur 8).

⁴ EDSTAC is the acronym for the Endocrine Disruptors Screening and Testing Advisory Committee. the bureaucratic process by which the Environmental Protection Agency is deciding how to screen and test new and existing chemicals for their potential to disrupt the endocrine systems of human beings and other species (<http://www.commonweal.org/EDSTAC.html>).

In vitro

1. Estrogen-receptor binding/transcriptional activation
2. Androgen-receptor binding/transcriptional activation
3. Steroidogenesis (to detect substances that interfere with the production of steroids by inhibiting cytochrome P450 enzymes)
4. Placental aromatase (alternative assay to detect substances that interfere with aromatase, an enzyme that converts testosterone to estradiol)

In vivo

- Rodent 3-day uterotrophic (assay for estrogenicity)
- Rodent 20-day pubertal female (assay for thyroid and estrogenic effects based on the age vaginal opening occurs in rats)
- Rodent 5-7-day Hershberger (assay for antiandrogens)
- Rodent 14-day intact adult male (to detect effects on male reproductive organs that are sensitive to antiandrogens and substances that inhibit testosterone production)
- Rodent 20-day thyroid/pubertal male (to detect androgens and antiandrogens)
- Frog metamorphosis (assay for thyroid and antithyroid effects based on tail resorption rate in frogs)
- Fish gonadal recrudescence (to detect substances that effect maturation in fish)

Figuur 8: overzicht van level 1 tests voor endocriene toxiciteit, met hun *in vitro* alternatieven (volgens US-EDSTAC, ICCVAM 2004).

7.2 Eindpunten en kandidaat tests voor screening van hormonale verstoring

Voor meerdere van hierna genoemde tests zijn er prevalidatie studies en protocols internationaal ter beschikking (ICCVAM, 2004; Stokes, 2003). Een uitgebreide evaluatie van potentieel testsystemen werd eerder reeds gemaakt in Europa (Holmes et al., 1998), waarbij bleek dat een breed spectrum aan cellulaire testsystemen hormonaal responsief zijn. Voor toepassing en validatie als screeningstest voor hormonale verstoring bleek echter een zeer beperkte set van tests in aanmerking te komen. De meest gangbare tests betreffen eindpunten in verband met effecten ter hoogte van de oestrogen of androgen receptor, en verstoring van steroid metabolisme. In het kader van een EU-6^{de} KP project 'REPROTECT' heeft ECVAM, in overleg met Japan en US, de prevalidatie geïnitieerd voor receptorbinding en transactivatietests voor de oestrogeen- en androgeenreceptor. Recentelijk gaat er ook meer aandacht naar effecten op schildklier, die minstens even belangrijk kunnen zijn zowel op vlak van groei van het organisme als voor onderhoud van hormonenbalans. Er is echter op dit vlak nauwelijks methodologisch werk welk bruikbaar is in het licht van dit project voor een snelle *in vitro* screeningstest.

7.2.1 Tests voor oestrogeen actieve stoffen

7.2.1.1 Proliferatie test met oestradiol-gevoelige cellen.

De meest besproken en toegepaste test is de E-screen, ontwikkeld door Soto et al. (1995). Humaan en foetaal kalfserum bevatten een inhibitor voor de proliferatie van oestradiol-gevoelige MCF-7 cellen (humane borstkankercellijn). Om de oestrogene activiteit te meten worden de cellen blootgesteld aan serum, behandeld met actieve kool waardoor de inhibitor geëlimineerd wordt. Blootstelling van de celculturen aan hetzij 17 β -oestradiol, of in

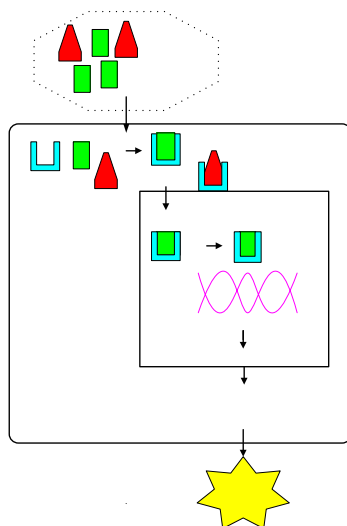
vergelijking aan een xeno-oestrogene stof laat toe de celproliferatie (na 7 dagen blootstelling) uit te drukken als maat voor potentieel oestrogene activiteit.

7.2.1.2 Oestrogen receptor (ER) bindingstests

Geïsoleerde cytosol preparaten van zoogdier of humane ER worden geëvalueerd voor competitieve binding van het vrouwelijke hormoon met een exogene stof. In de meeste gevallen wordt gewerkt met uterus materiaal van de rat. De test kan opgezet worden in de vorm van een competitie of een titratie assay met een radio-actief gelabeld substraat. Voor algemene toepassing zou een niet-radioactieve methode, gebruik makend van fluorescente probes de voorkeur genieten. Concreet werd door UG een snelle test, genaamd 'ERBA' ontwikkeld die gebruik maakt van een hybride proteïne (GST-TER) tegen de humane oestrogeen receptor. Via een competitieve bindingsassay in een 96 microtiterwell plaat, en een meting van de verdringing ter hoogte van de receptor, gebruik makend van radioactief 17β -oestradiol, wordt de oestrogene potentie van een zuivere stof of milieustaal bepaald (Witters et al., 2003).

7.2.1.3 Oestrogen receptor transactivatie test

Er komen meerdere getransformeerde cellulaire systemen in aanmerking voor studie van estrogen-receptor activatie. Hierbij zijn er zowel stabiel als transient getransfecteerde cellijnen ter beschikking. Bovendien zijn er testsystemen in gebruik die hetzij met gisten (meer robuust), hetzij met zoogdiercellen werken. Een schema welk het principe van dergelijke test voorstelt wordt gegeven in figuur 9. Dit schema is een voorstelling waarbij gewerkt wordt met een humane borstkankercellijn, MCF-7 die getransformeerd werd. Analooq zijn er andere cellen als T47-D of Hela cellen die op vergelijkbare manier getransformeerd werden met een oestrogeen receptor. Voor zoogdiercellijnen zijn er varianten waarbij hetzij de ER- α , hetzij de ER- β geïntegreerd is in het testsysteem. Er wordt voornamelijk gewerkt met de ER- α , hoewel beide systemen relevant zijn. Met het oog op diverse milieutoepassingen zijn er getransformeerde gistcellen ter beschikking die qua robuustheid soms voordelen bieden (zie later: evaluatie van testsystemen).



Figuur 9: principe van een oestrogen receptor transactivatie test (vb. MVLN-test met humane borstkankercellijn)

7.2.2 Tests voor androgeen actieve stoffen

Analoog aan voorgaande, zijn er eveneens cellulaire testsystemen in ontwikkeling die toelaten om de androgene of xeno-androgene werking van stoffen, medicijnen en milieupolluenten op te sporen. Onderzoek op dit terrein is minder uitgebreid aangezien in het kader van hormoonverstoring gebleken is dat het aandeel van contaminanten welk potentieel op de minder selectieve oestrogeen-receptor werkt, een orde groter is dan deze die potentieel androgeen verstorend zijn.

7.2.2.1 Androgeen receptor (AR) bindingstests

Geïsoleerde cytosol preparaten van zoogdier of humane AR worden bekomen uit prostaatmateriaal en geëvalueerd voor competitieve binding van het mannelijk hormoon, testosteron, of analogen, met een exogene stof. Testoptimalisatie betekent juiste verhoudingen van receptor- en ligandconcentraties te zoeken en op die manier een curve voor competitieve binding (Michaëlis-Menten relatie, bepaald door K_d en B_{max}) te bepalen. In deze tests is er vooral ervaring met het werken met een radio-actief gelabeld hormonaal substraat.

7.2.2.2 Androgeen receptor transactivatie test

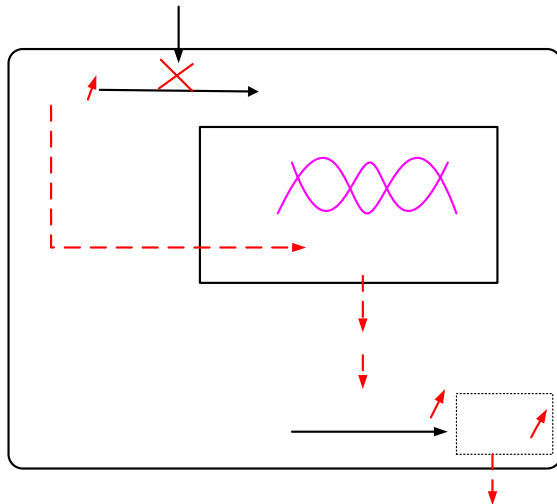
Er zijn zowel stabiel als transient getransfecteerde cellijnen ter beschikking waar de androgen-receptor wordt ingebracht. Meest gebruikte cellijnen zijn COS-1, LNCaP en PC cellen. Bovendien zijn er testsystemen die met gisten werken. Het principe van de test is zeer analoog aan hetgeen beschreven werd voor de oestrogeen transactivatie test.

7.2.3 Tests voor aromatase activiteit

Aromatase is een enzyme van het cytochrome P450 complex welk verantwoordelijk is voor de oestrogen synthese, waarbij androgenen zoals testosteron en androstenedion omgezet worden naar oestradiol en oestron. Het aromatase komt voor in ovaria, placenta, uterus, testis, hersenen en in vetweefsel. Er zijn zowel *in vitro* subcellulaire (microsomale) als cellulaire tests. Er zijn in principe 2 benaderingen om de activiteit van het enzyme te meten, nl. de product isolatiemethode en de radiometrische methode.

De eerste methode, die meest geschikt is bij gebruik van subcellulaire microsomale fracties zal na toediening van een substraat (bijv. androstenedion of testosteron) en gepaste incubatietijd het eindproduct, nl. de vorming van oestrogenen gaan meten. Er wordt gewerkt met radio-actief gelabelde steroïden, die na dunne laag chromatografie of HPLC gescheiden worden en gekwantificeerd worden via massa spectrometrie, radio immuno-assays (RIA) of enzyme-linked assays (ELISA).

Bij de radiometrische methode wordt de productie van getritieerd water als maat voor aromatase activiteit gehanteerd. Een incubatie gebeurt met $[1\beta\text{-}^3\text{H}]\text{-androstenedione}$. Door de werking van aromatase wordt katalytisch de covalente binding op de steroïdenring afgesplitst met vorming van $^3\text{H}_2\text{O}$. Dit eindproduct kan gemeten worden na extractie met organische solventen of dextran gecoat actieve kool. Voor elk van deze assays met hetzij microsomale preparaten, hetzij cellen werden de protocols geëvalueerd en bediscussieerd voor toepassing bij screening van stoffen die potentieel interferen met de aromatase activiteit (Timm, 2003). Een schematische voorstelling van het testprincipe is gegeven in volgende figuur 10.



Atrazine

Cell

Figuur 10: principe van de aromatase test in een planta cellulair systeem (bv. JEG-3 cellen of H295R cellen)

phosphodiesterase

c-AMP

AM

7.2.4 Tests voor schildklier activiteit

De schildklierhormonen, T3 en T4, vervullen in vertebraten een belangrijke rol bij foetale en prenatale ontwikkeling en groei. Bij zoogdieren zijn ze belangrijk bij de ontwikkeling van het zenuwstelsel en de aanleg van geslachtsorganen, terwijl ze bij amfibieën belangrijk zijn in de metamorfose. Er zijn diverse klassen van chemicaliën die interfereren met de homeostase van het schildklierhormoon. Effecten ter hoogte van de schildklier zelf, het metabolisme van het schildklierhormoon, de schildklierhormoonreceptor en de transportglobulines voor het schildklierhormoon werden beschreven (Brouwer et al. 1998; Shmutzler et al., 2004). Er zijn slechts enkele *in vitro* tests recent in ontwikkeling voor het evalueren van dergelijke effecten.

Stimulation of c-AMP-mediated protein kinase pathway

7.2.4.1 T-screen

De test maakt gebruik van de GH3 cellijn, een rat hypofyse tumor cellijn die voor proliferatie afhankelijk is van het schildklierhormoon, T3 of thyroïd-stimulerende hormoon. De interactie van xenobiotische stoffen en milieustoffen met de T3-receptor worden gemeten (Gutleb et al., 2004). Zowel agonistische activiteit (verhoogde proliferatie) als antagonistische activiteit (competitie met T3 voor opname in cel) worden gedetecteerd. Hoewel deze test negatief scoorde voor een aantal pesticiden, en stoffen waarvoor *in vivo* effecten op schildklierfunctie vastgesteld werden, bleek een significante verandering van celproliferatie bij blootstelling aan extracten van sediment. Het ontbreken van *in vitro* effecten bij furosemide, mefenamic en lithiumchloride kan te maken hebben met de constitutie van een *in vitro* systeem, waarbij de cascade van opname en binding van hormonen verschillend is tov *in vivo* studies (Gutleb et al., 2004).

A

7.2.4.2 T4-TTR assay

Androstenedione

Deze test berust op competitieve binding voor het schildklierhormoon, T4 of tetra-joodthyrone in acellulaire systemen (Karami-Tehrani et al., 2001; Houtman et al., 2004).

HOOFDSTUK 4

EVALUATIE VAN DE BRUIKBAARHEID EN RELEVANTIE VAN TOXICOLOGISCHE METHODEN IN DE VLAAMSE CONTEXT

1 CONTEXT EN VERANTWOORDING

Op de plenaire vergadering van 16 juni 1998 heeft de Vlaamse Gezondheidsraad unaniem een advies goedgekeurd inzake onderzoeksinspanning en kenniscentrum m.b.t. gezondheidseffecten van milieufactoren.

Dit advies stelt ondermeer:

“Daarnaast is het meer dan wenselijk dat de Vlaamse regering zou beslissen de nodige, bij voorkeur additionele maar indien nodig reeds beschikbare, kredieten te besteden aan onderzoek naar gezondheidseffecten van milieufactoren. Dit onderzoek moet zowel biomonitoring aan de hand van eenvoudige biologische testsystemen als epidemiologisch en moleculair-epidemiologisch (biomonitoring) onderzoek op de mens omvatten.”

In het advies worden volgende onderzoekslijnen voorgesteld:

1° Biomonitoring aan de hand van eenvoudige biologische testsystemen.

Dit omvat:

- *het meten, op relevante plaatsen, van de genotoxische activiteit aanwezig in lucht, water, voeding, bodem en drinkwater middels de bacteriële Ames mutageniciteitstest en/of een test op Tradescantia (kleine plantjes).*
- *het meten van de hormoonontregelende activiteit (inclusief xeno-oestrogene activiteit) middels daartoe geschikte in vitro testen, en de ontwikkeling van deze voor zover nodig.*

Deze biomonitoring is een aanvulling op de metingen van scheikundige stoffen zoals die tot op heden gebeuren. Het voordeel ervan is dat ook gezondheidsbedreigende activiteit verbonden aan niet geïdentificeerde of niet als gevaarlijk erkende stoffen kan opgespoord worden, en dat deze tests gezondheidseffecten van milieufactoren op een geïntegreerde wijze kunnen inschatten, met inbegrip van de belangrijke synergistische effecten die kunnen optreden bij blootstelling aan de complexe mengsels van scheikundige stoffen, zoals die in het leefmilieu voorkomen.

Dit soort onderzoek kan toelaten een kaart op te maken van de gezondheidsbedreigende milieuverontreiniging in Vlaanderen en kan daarnaast, in combinatie met scheikundige fractionatie van milieustalen, toelaten scheikundige stoffen te identificeren die verantwoordelijk zijn voor de gezondheidsschadende effecten van milieuverontreiniging. Dergelijk onderzoek kan eventueel door de Vlaamse Milieumaatschappij verricht worden.

2° Epidemiologisch en moleculair-epidemiologisch (biomonitoring) onderzoek op de mens.

- a) *Beschrijvend epidemiologisch onderzoek met gebruik van de bestaande registratie van gezondheidsindicatoren.*
- b) *Gericht analytisch epidemiologisch onderzoek.*
In het gericht analytisch epidemiologisch onderzoek kunnen de klassieke onderzoeksoptellingen gebruikt worden (case-control, follow-up, interventiestudie e.a.), waarbij dan zowel de klassieke meetmethoden voor blootstelling en uitkomst (bv. gevalideerde vragenlijst voor blootstellingen of voor effect zoals "time-to-pregnancy",

diagnosestelling voor een specifieke aandoening), als nieuwe technieken uit de moleculaire biologie (zoals biologisch-moleculaire blootstellings- en effectmetingen: biomonitoring) kunnen gebruikt worden.

Inderdaad, fysische en chemische metingen volstaan niet als basis voor de inschatting van gezondheidseffecten, omdat

- de grote meerderheid der gezondheidsschadende stoffen niet geïdentificeerd is,
- er grote onzekerheid bestaat betreffende de gezondheidsschadende potentie van individuele stoffen,
- complexe mengsels van scheikundige stoffen, zoals die in het leefmilieu voorkomen, belangrijke synergistische effecten kunnen vertonen m.b.t. gezondheidsschade.

Het betreffende advies van de Vlaamse gezondheidsraad stelt dan ook dat er nood is aan biomonitoring aan de hand van eenvoudige biologische testsystemen. Het voordeel ervan is dat ook gezondheidsbedreigende activiteit verbonden aan niet-geïdentificeerde of niet-als-gevaarlijk-erkende stoffen kan opgespoord worden, en dat deze tests gezondheidseffecten van milieufactoren op een geïntegreerde wijze kunnen inschatten, met inbegrip van de belangrijke synergistische effecten die kunnen optreden bij blootstelling aan de complexe mengsels van scheikundige stoffen, zoals die in het leefmilieu voorkomen.

In een verder stadium van het effectgericht maken van het meetnet kunnen dan, via een beroep op externe medewerking van competente onderzoeksgroepen, ook metingen van biologische parameters bij mensen gebeuren om de werkelijke effectieve blootstelling, de inwendige dosis en/of de "target"-dosis (de dosis t.h.v. het doelwit-weefsel) te kennen en door middel van "vroeg" biologische effecten op de mens een ziekmakend effect met meer gevoeligheid in te schatten en vroegtijdig op te sporen.

Enkele specifiek Vlaamse aspecten

Vlaanderen is een klein, maar drukbevolkt, zwaar geïndustrialiseerd gewest met een zeer grote verkeersdrukke, dat echter welvarend is en een bevolking telt die aanzienlijke verwachtingen heeft inzake gezondheid en welzijn.

Inzake effectgericht meten op milieustalen is er, zoals elders in Europa, in de context van een gestructureerd meetnet nauwelijks ervaring. De beschikbare instellingen en middelen zijn beperkt. Daartegenover staat wel dat het denkbaar is dat mettertijd aanzienlijk meer middelen worden ingezet voor de bewaking van het leefmilieu in termen van gezondheidsrisico's.

Het lijkt redelijk tests voor effectgericht meten in te zetten op drie niveaus:

1° niveau: Voor het inschatten op korte termijn van gezondheidsrisico's samenhangend met een (lokaal) incident of met bijzondere weers- of andere omstandigheden. Dit past onder meer in een rampenplan.

2° niveau: dat moet dienen om op vele plaatsen, eventueel meermaals per jaar, een grove inschatting te maken van de gezondheidsrisico's samenhangend met milieufactoren.

3° niveau: Deze tests moeten een meer grondige evaluatie mogelijk maken van gezondheidsrisico's samenhangend met milieufactoren. Deze tests moeten toelaten:

- 1) om het gezondheidsrisico van veel voorkomende milieutoestanden waaraan een groot deel van de bevolking een groot deel van de tijd is blootgesteld met grotere nauwkeurigheid in te schatten;
- 2) om nog onbekende agentia of activiteiten (van mengsels) die potentiëel belangrijke gezondheidsrisico's met zich kunnen brengen, op te sporen (bron-gerichte aanpak).

De tests van het eerste niveau dienen idealiter relatief goedkoop te zijn en moeten vlot en frequent kunnen ingezet worden. De tests van het tweede niveau moeten idealiter een hoge relevantie; sensitiviteit en specificiteit bezitten in termen van het pathogeen effect dat men wenst op te sporen of in te schatten.

Het spreekt voor zich dat een bepaalde expertise in verband met relevantie van biologische eindpunten voor schadelijke effecten door blootstelling via de lucht vereist is. Betrokken onderzoekspartners kunnen op basis van vorige studies en onderzoeksactiviteiten hun ervaring en competentie illustreren. Binnen deze context is toch een objectieve en wetenschappelijk onderbouwde selectie van tests nodig door enerzijds een kritische beoordeling van beschikbare literatuurgegevens en anderzijds een evaluatie op basis van objectieve criteria (zie methodologie).

Uit de overzichten in hoofdstuk 3 blijkt het aanbod van tests voor effect-gerichte metingen. De tests zijn ingedeeld op basis van hun werkingsmechanisme. Voor een meerderheid van tests is er vooral ervaring op vlak van studie van chemische stoffen. In beperkte mate werden enkele tests reeds toegepast op milieumatrices, en nog meer specifiek op bemonstering van luchtstalen.

Uit het aanbod van tests moet een toxicologisch en pathologisch relevante, maar kosten-effectieve selectie gemaakt worden van tests die in praktijk toepasbaar zijn voor een meetnet in Vlaanderen. Na de literatuurstudie (hoofdstukken 1, 2 & 3) zal in dit hoofdstuk een evaluatieprocedure met objectieve criteria voor de tests, toepasbaar voor elk van de eindpunten, voorgesteld worden en deels toegepast. Om de selectie of ranking van tests mogelijk te maken, worden voor elk van de criteria bepaalde klassen gedefinieerd met een getalscore, en gewichtsfactoren per criterium. Dit levert ons een matrix van tests voor elk van de eindpunten met een hoogste score voor de te selecteren tests. De voorgestelde methodologie moet beschouwd worden als een handleiding en biedt de gegevens om de keuze voor bepaalde tests per eindpunt te motiveren. De methodologie wordt toegepast voor enkele tests voor de eindpunten systemische toxiciteit, immuun-respiratoire toxiciteit en hormoon-reproductietoxiciteit. De informatie per test, nodig voor de evaluatie per criterium, wordt geregistreerd op standaardformulieren 'evaluatiefiche'. Al de formulieren met verzamelde gegevens van literatuurstudie of eigen gegevens op basis van de ervaring in Vito- of UG-laboratoria kunnen geraadpleegd worden in bijlage aan het studierapport. Er wordt in de mate van het mogelijke een verwijzing naar de brongegevens gemaakt om kwaliteitscontrole op de evaluatieprocedure toe te laten. Voor het luik genotoxiciteit en kankerverwekkend vermogen gebeurde volgens een aantal criteria een analoge evaluatie, waarbij echter geen afzonderlijke fiches per test werden samengesteld.

Deze gegevens voor elk van de testcriteria dienen als basis voor een selectie van de tests, die in het luik resultaten bediscussieerd en tegenover elkaar afgewogen worden. Deze informatie is essentieel als input voor het volgende hoofdstuk omtrent de opzet van een monitoringstrategie, met een voorstel van ontwerp 'pilotproject'. Ter aanvulling wordt er eveneens een voorstel gemaakt met betrekking tot bemonstering van lucht, op basis van de vergelijkende literatuurstudie in hoofdstuk 2.

2 METHODOLOGIE

Een belangrijke overweging bij de selectie van de tests is de finaliteit van de te selecteren test. In dit project is het de bedoeling om potentiële blootstelling aan milieugevaarlijke stoffen, met diverse werkingsmechanismen, in lucht op te sporen. Dit betekent dat, in plaats van rechtstreeks effecten op de menselijke gezondheid te meten, we veeleer een detectie-instrument zullen opzetten voor aanwezigheid van stoffen die potentieel de gezondheid kunnen schaden (zie hoofdstuk 1). De tests moeten daarom eerder beschouwd worden als screeningsinstrumenten, die

1) de humane biomerker- en effectstudies kunnen voorafgaan en

- 2) aanwijzingen geven over potentiële bronnen van vervuiling via doorgedreven toxiciteitsidentificatiestudies indien één of meerdere tests positief zouden scoren. Een toxiciteitsidentificatieprocedure is een biotest-gestuurde chemische fractionatie om oorzakelijke stoffen/stofgroepen te identificeren. Deze brongerichte benadering vindt voor steeds meer milieumatrices (blootstellingsroutes) toepassing, maar er is vooral voor bijvoorbeeld afvalwater veel ervaring opgebouwd door Vito in de laatste jaren (Van Biesen et al., 2000).

Voor een verkennende monitoring zijn effect-gerichte tests in eerste instantie aangewezen vermits ze meestal eenvoudig en snel zijn, waardoor de kostprijs relatief laag is. Het type van eenvoudige tests kunnen onder verschillende omstandigheden geïmplementeerd worden waarbij 2 scenario's van toepassing kunnen zijn:

- Scenario 1 = voor het inschatten op korte termijn van gezondheidsrisico's samenhangend met een (lokaal) incident of met bijzondere weers- of andere omstandigheden. Dit past onder meer in een rampenplan.
- Scenario 2 = lange termijn scenario of geïntegreerde monitoring van milieukwaliteit als effectgericht bewakingssysteem, bijv. scenario voor monitoring of trendanalyse.

De duurdere, meer omslachtige biomarker- en effecttests, meestal voor *in vivo* toepassing zijn meer relevant, maar worden pas belangrijk om in te schakelen wanneer de eenvoudige tests voor screening van effecten positief scoren. In dit geval kan verdergaand onderzoek gemotiveerd worden:

- Scenario 3 = voor een diepgaand onderzoek naar mogelijke problemen voor humane gezondheid.

De methodologie met een lijst van relevante criteria wordt in tabel 15 hierna gegeven, met toepassing voor scenario 1 en 2. Vanwege de diversiteit qua eindpunten en tests is niet elk criterium van toepassing (nvt=niet van toepassing) of is niet steeds voldoende literatuurinformatie beschikbaar (ovi=onvoldoende informatie), hetgeen dan in de evaluatiefiche gemeld wordt. Voor een aantal tests zijn er kwantitatieve gegevens beschikbaar omtrent testperformantie (bijv. selectiviteit en sensitiviteit van transformatietests, eindpunt kankerverwekkend vermogen), die niet volledig kunnen ondergebracht worden bij onderstaande definities en criteria. Door de auteurs zal ook deze informatie zoveel mogelijk besproken worden en gebruikt worden in vergelijking met het hier voorliggende beoordelingssysteem

Voor het beoordelingssysteem in dit project wordt een beschrijving per criterium met een specificatie voor indeling in klassen, met respectievelijke score en wegingsfactoren gegeven. Bij de verschillende scenario's zullen andere criteria meer of minder belangrijk zijn, hetgeen uitgedrukt wordt door de verschillende gewichtsfactoren.

Tabel 15: overzicht van selectiecriteria

Selectie criterium		Afkorting	Gewichtsfactor	
			Scenario 1	Scenario 2
1	Kosten van uitvoering	KU	2	3
2	Snelheid van uitvoering	SU	5	1
3	Responspectrum en gevoeligheid	RS	5	5
4	Standaardprocedure en ringstudies	SR	3	4
5	Beschikbaarheid testsysteem	BT	4	2
6	Relevantie	RE	5	5
7	Toepassing voor lucht	TL	3	4
8	Internationale erkenning	IE	1	4

2.1 Kosten van uitvoering (KU)

Definitie: de kost die nodig is om de test uit te voeren (personeelskost) met onkosten van verbruiksgoederen en onderhoud van testsysteem en/of organismen. Voor de personeelskost wordt voor uniformiteit gerekend met een gemiddelde kost van 45 € per manuur. Er wordt uitgegaan van een regelmatig gebruik van de test en toepassing voor zuivere stoffen, (dus exclusief kost van staalbehandeling) en simultane uitvoering voor meerdere stoffen (of desgevallend milieustalen).

Tabel 16: Handleiding voor het criterium werkingskost

Kosten van uitvoering in €		
Scenario	Scenario 1	Scenario 2
Score 0	> 5000	
Score 3	≤ 5000	
Score 5	≤ 1500	
Score 7	≤ 750	
Score 10	≤ 250	
Gewichtsfactor	2	3

2.2 Snelheid van uitvoering (SU)

Definitie: de duur van de test tussen aanvang van de blootstelling en behalen van het eindresultaat met de berekening en rapportage ervan.

Tabel 17: Handleiding voor het criterium snelheid van uitvoering

Snelheid van uitvoering + rapportering in # dagen		
Scenario	Scenario 1	Scenario 2
Score 0	> 14	
Score 3	≤ 14	
Score 5	≤ 7	
Score 7	≤ 3	
Score 10	≤ 1	
Gewichtsfactor	5	1

2.3 Responsspectrum en sensitiviteit (RS)

Definitie: het bereik van chemische klassen van stoffen of agentia die voorkomen in de lucht (zie lijst in tabel 18) waarvoor de test werd toegepast en dus een detecteerbaar signaal geeft.

De beoordeling gebeurt op basis van het % aandeel van de stoffen en agentia die een positieve respons geven binnen de lijst van stoffen die effectief getest werden voor het eindpunt. De beoordeling gebeurt aan de hand van criteria volgens tabel 19.

Er wordt eveneens in de mate van beschikbaarheid, informatie verzameld over de gevoeligheid van de tests. Afhankelijk van de tests is cijfermateriaal ivm gevoeligheid onder verschillende vormen beschikbaar, hetgeen een vergelijkende evaluatie in het objectief scoresysteem in de weg staat. In de tabel van evaluatiefiche zullen echter specifieke gegevens over gevoeligheid, bijvoorbeeld als LOEC-waarde of EC50-waarde, of andere te specificeren parameter vermeld worden. Vanwege het belang van het criterium gevoeligheid zal eerder een kwalitatieve evaluatie van de test gegeven worden, door vergelijking met andere beschikbare gegevens voor meerdere tests per eindpunt.

Tabel 18 : Lijst van stoffen/stofgroepen /agentia die in lucht kunnen voorkomen en risico's voor blootstelling inhouden (gebaseerd op Air Quality Framework 96/62/EC, WHO guidelines en tabel 3)

Groep	Specificaties	Getest (x)	Signaal (+ of -)	Gevoeligheid (LOEC of...)	Referentie
Partikels	Niet-gespecificeerd qua fractie of samenstelling				
	PM 10				
	PM 2.5				
	PM 1				
	Ultra-fijn stof				
	Dieselpartikels				
	Vliegias				
	Synthetische part. (C-, C/Fe-,...)				
Andere: ..roet					
Extracten van partikels	Niet-gespecificeerd				
	Extract in organisch oplosmiddel (hexaan, dichloormethaan,...)				
Anorgan. pollutanten	Metalen: katalysatoren (Pt, Pd,...)				
	Andere metalen: Pb, Cd, As, Cr, Sb, Mn, Cu, Zn, Hg, Va, Ni...				
	Fluoride				
	Asbest				
Organische pollutanten	PAK's				
	PCB's				
	MAK's: Benzeen, toluen, styreen,...				
	Andere: acrylonitrile, butadien, dichloormethaan, dichloorethaan, formaldehyde, trichloorethyleen, tetrachloorethyleen, vinylchloride,.....				
Andere				
Totaal getest in %	+/x				

Tabel 19 : Handleiding voor het criterium responspectrum

Respons in % stoffen/agentia met signaal (zie tabel 18)		
Scenario	Scenario 1	Scenario 2
Score 0	<20%	
Score 3	20-40%	
Score 5	40-60%	
Score 7	60-80 %	
Score 10	80-100%	
Gewichtsfactor	5	5

2.4 Standaardprocedure en ringstudies (SR)

Definitie: er is een standaardprocedure ter beschikking waardoor de testmethode op een éénduidige en vergelijkbare manier kan uitgevoerd worden. Met behulp van beschikbare procedures werd reeds voor zuivere stoffen en/of luchtstalen een vergelijkende ringtest opgezet met betrokkenheid van minstens 3 laboratoria.

Criteria als testherhaalbaarheid (variabiliteit binnen één labo) en testreproduceerbaarheid (variabiliteit tussen meerdere testlaboratoria) worden in deze studie niet geëvalueerd aangezien de beschikbare gegevens voor elk van de testtypes en eindpunten nog erg beperkt zijn. Bij uitzondering zal een kwalitatieve bespreking gebeuren voor die tests waar er voldoende testgegevens beschikbaar zijn.

Tabel 20 : Handleiding voor het criterium standaardprocedure en ringstudies

Standaardprocedure en ringstudies		
Scenario	Scenario 1	Scenario 2
Score 0	Methode niet gepubliceerd.	
Score 3	Methode is gepubliceerd in wetenschappelijke literatuur (peer reviewed)	
Score 5	Draft van standaardprocedure is beschikbaar, geen ringstudie	
Score 7	Draft van standaardprocedure is beschikbaar en gegevens ringstudie beschikbaar	
Score 10	Ringstudie uitgevoerd en procedure is in fase van goedkeuring of reeds goedgekeurd via internationale organisatie (bv. ISO, OECD, ECVAM, FRAME,..)	
Gewichtsfactor	3	4

2.5 Beschikbaarheid van testsysteem/testorganismen (BT)

Definitie: beschikbaarheid of rekening te houden met wettelijke bepaling omtrent testsysteem of testorganismen.

Tabel 21 : Handleiding voor het criterium beschikbaarheid of wettelijke beperkingen rond gebruik van testsysteem of organismen

Beschikbaarheid testsysteem		
Scenario	Scenario 1	Scenario 2
Score 0	Testsysteem/testorganismen zeer beperkt beschikbaar (slechts 1 leverancier in het buitenland)	
Score 3	Testsysteem/testorganismen beperkt beschikbaar (niet het ganse jaar & slechts 1 of 2 leveranciers)	
Score 5	Testsysteem/testorganismen kunnen steeds aangekocht worden, gans het jaar en bij meerdere leveranciers	
Score 7	Testsysteem/testorganismen zijn continu binnen labo beschikbaar (mits éénmalige aankoop), maar er zijn wettelijke restricties of controles qua ethische aspecten of veiligheidsvoorschriften (GMO's en infectieuze organismen) waaraan eerst voldaan moet worden of gespecialiseerd onderhoud van cultuur verhoogt werkingskost	
Score 10	Testsysteem/testorganismen zijn vlot en continu binnen labo beschikbaar (mits éénmalige aankoop), met een minimum aan onderhoudskosten	
Gewichtsfactor	4	2

2.6 Relevantie (RE)

Definitie: de test heeft via validatie en onderzoek een relatie aangetoond tussen gemeten signaal en effecten die relevant zijn voor gezondheidschade.

Tabel 22: Handleiding voor het criterium relevantie

Relevantie		
Scenario	Scenario 1	Scenario 2
Score 0	Test detecteert aanwezigheid van zuivere stoffen.	
Score 3	Test detecteert aanwezigheid van milieugevaarlijke stoffen	
Score 5	Test detecteert de aanwezigheid van milieugevaarlijke stoffen met toxische werking, relevant voor blootstelling via lucht (zie ook tabel 3)	
Score 7	Gemeten signaal in screeningstest geeft indicatie voor potentiële <i>in vivo</i> -effecten volgens zelfde werkingsmechanisme bij individuele organismen	
Score 10	Gemeten signaal geeft indicatie voor potentieel pathologische effecten, op basis van bewezen relatie tussen ziekte en toxisch mechanisme	
Gewichtsfactor	5	5

2.7 Toepassing voor lucht (TL)

Definitie: de toepasbaarheid van de methode voor evaluatie van milieumonsters, met name voor stalen van bemonstering van lucht voor particulier materiaal of vluchtige substanties.

Tabel 23: Handleiding voor het criterium toepasbaarheid

Toepasbaarheid		
Scenario	Scenario 1	Scenario 2
Score 0	Methode werd nog niet toegepast voor milieumonsters, uitsluitend zuivere stoffen of voor milieumonsters, hetzij in beperkte mate, hetzij met niet-consistente resultaten.	
Score 3	Methode werd reeds toegepast voor zuivere stoffen in lucht	
Score 5	Methode werd reeds toegepast voor milieumonsters van lucht, in beperkte mate (≤ 3 literatuurreferenties)	
Score 7	Methode werd herhaaldelijk met succes toegepast voor luchtmonsters (> 3 literatuurreferenties van \neq laboratoria)	
Score 10	Standaardmethode voor luchtmonsters (internationaal erkend)	
Gewichtsfactor	3	4

2.8 Internationale erkenning (IE)

Definitie: de methode wordt internationaal aanvaard als bruikbaar en kent reeds toepassing in monitoringstudie of grootschalige campagnes rond effectgericht meten in lucht.

Tabel 24 : Handleiding voor het criterium internationale erkenning

Internationale erkenning		
Scenario	Scenario 1	Scenario 2
Score 0	Methode wordt internationaal nog niet gebruikt in onderzoeksprogramma's voor metingen van lucht	
Score 5	Methode maakt deel uit van een internationaal monitoringprogramma of netwerk voor luchtmetingen	
Score 10	Methode wordt door Europa wettelijk geïmplementeerd in meetnet voor lucht	
Gewichtsfactor	1	4

3 RESULTATEN VAN EVALUATIE TESTS VOLGENS CRITERIA

3.1 Evaluatiefiches voor tests

In aanvulling bij de beschrijving in voorgaand hoofdstuk werd nuttige informatie omtrent toepassing van tests verzameld in tabellen met type test, aard van blootstelling, gemeten effect en respectievelijke referentie. Vanwege de veelheid aan informatie zijn dergelijke tabellen opgesteld voor tests met eindpunten voor immuun-respiratoire toxiciteit (bijlage 2.2). en voor reproductie- en hormoon toxiciteit (bijlage 3.1). Op basis van deze tabellen werd voor elk van de meest belangrijke en relevante tests een fiche gemaakt. Deze fiches werden eveneens in bijlage verzameld en gesorteerd met een code volgens eindpunt en een volgnummer. Fiches met eindpunt voor systemische en cytotoxiciteit (CS) in bijlage 1.1.) fiches met eindpunt immuun- en respiratoire toxiciteit (IR) in in bijlage 2.3 en fiches met eindpunt hormoon- en reproductietoxiciteit in bijlage 3.2. Dit zijn ook de codes die hierna gehanteerd zullen worden in de vergelijkende tabellen voor tests met hun respectievelijke criteria en behaalde punten. De fiches geven informatie omtrent enerzijds het principe van de test, anderzijds de uitvoeringsmodaliteiten. De literatuurreferenties waarbij de betreffende test gebruikt werd zijn eveneens opgelijst per fiche. In de overzichtstabellen hierna worden de gegevens uit de evaluatiefiches samengevat en laat de berekening van de totaalscore een ranking toe van de tests. Deze ranking is slechts een leidraad bij de verdere kwalitatieve bespreking van de tests die in aanmerking komen om deel uit te maken van een effectgericht meetinstrument. Hoewel er voor de tests genotoxiciteit geen evaluatiefiches werden opgemaakt wegens tijdsgebrek, wordt voor dit eindpunt een analoge kwalitatieve en semi-kwantitatieve evaluatie gemaakt aan de hand van criteria zoals kostprijs, reproduceerbaarheid,...die aanleunen bij voorgaande beschrijving.

3.2 Evaluatie van tests voor cytotoxiciteit en systemische toxiciteit

In het hoofdstuk omtrent beschrijving van testsystemen (hoofdstuk 3) worden voor het luik systemische toxiciteit diverse eindpunten besproken:

1. Acute toxiciteit
 - Cytotoxiciteitstest voor membraanschade*
 - MTT assay*
 - De Alamar Blue test*
 - De neutraal rood cytotoxiciteitstest*
2. Chronische toxiciteit
3. Nefrotoxiciteit
4. Neurotoxiciteit
5. Cardiovasculaire toxiciteit
6. Oxidatieve stress en vorming van reactieve zuurstofdeeltjes (ROS)
7. Hepatotoxiciteit

In evaluatiefiches in bijlage 1.1. en resultaatbespreking hierna worden enkel de tests voor acute toxiciteit besproken, respectievelijk 1.b (fiche CS-3), 1.c (fiche CS-2) en 1.d (fiche CS-1) en voor oxidatieve stress, namelijk 6 (fiche CS-4) besproken.

Test 1.a wordt niet in de bespreking opgenomen aangezien met radioactief materiaal gewerkt dient te worden. Immers vanwege veiligheidsmaatregelen is dergelijke activiteit niet

mogelijk in eender welk laboratorium. Geen evaluatiefiches zijn opgenomen voor voor eindpunten 2 tem 5 en 7 aangezien geen *in vitro* assays voorhanden zijn die op korte termijn geschikt zijn en toepasbaar voor screening van milieustalen.

Toepassing van cytotoxiciteitstests CS-1 tem CS-3:

- Een cytotoxiciteitstest wordt gebruikt om de subtoxische concentratie te bepalen van een staal.
- Aan deze subtoxische dosis kunnen cellen blootgesteld worden om andere eindpunten te evalueren, zo kan men uitsluiten dat vb genetische schade het onrechtstreeks gevolg is van celschade.
- Het onderscheid tussen een scenario's 1 en 2 is hier niet relevant aangezien de cytotoxiciteitstest wordt ingeschakeld in functie van andere eindpunten.
- Het responspectrum wordt niet in detail weergegeven, wel of de cytotoxiciteitstest volgens de literatuur reeds werd toegepast op relevante matrices.

Overzicht van de tests waarvoor een fiche werd samengesteld:

- CS-1: meting van cytotoxiciteit met de neutraal rood methode
- CS-2: meting van cytotoxiciteit met de alamar blue methode
- CS-3: meting van cytotoxiciteit met de MTT methode
- CS-4: meting van oxidatieve schade

Code test	Evaluatiecriterium/gewichtsfactor-scenario 1								Totaal score (% van max.)
	KU	SU	RS	SR	BT	RE	TL	IE	
	2	5	5	3	4	5	3	1	
CS-1	7	7	NVT	10	7	7	10	0	172 (61)
CS-2	10	7	NVT	3	7	7	5	0	142 (51)
CS-3	7	7	NVT	10	7	7	10	0	172 (61)
CS-4	7	5	10	3	7	7	7	0	182 (65)

Code test	Evaluatiecriterium/gewichtsfactor-scenario 2								Totaal score (% van max.)
	KU	SU	RS	SR	BT	RE	TL	IE	
	3	1	5	4	2	5	4	4	
CS-1	7	7	NVT	10	7	7	10	0	157 (56)
CS-2	10	7	NVT	3	7	7	5	0	118 (42)
CS-3	7	7	NVT	10	7	7	10	0	157 (56)
CS-4	7	5	10	3	7	7	7	0	165 (59)

Als cytotoxiciteitstest werd de MTT-test (CS-3) weerhouden voor gebruik in een testbatterij voor de screening van luchtstalen met een score boven 50%.

De neutraal rood test (CS-1) is eveneens een goede cytotoxiciteitstest, maar uit eigen ervaring (Vito) is geweten dat deze test niet geschikt is voor analyse van partikels in suspensie, aangezien partikels samenklitten met cellen en daardoor onvoldoende en op onvoldoende reproduceerbare wijze weg te wassen zijn. De MTT test geniet dus de voorkeur voor analyse, met het voordeel dat ze toepasbaar is voor tests met luchtpartikels.

De test voor oxidatieve schade meet een interessant eindpunt, relevant voor analyse van luchtstalen. Dit is eveneens een eindpunt welk belangrijk is in relatie tot de tests voor immuun-respiratoire toxiciteit enerzijds en genotoxiciteit anderzijds.

3.3 Evaluatie van tests voor kankerverwekkend vermogen of genotoxiciteit

Hierna volgt per scenario een beschouwing over de tests die als de meest geschikte voor de effectgerichte biomonitoring op milieustalen inzake genotoxiciteit en carcinogeniciteit kunnen weerhouden worden. Per criterium volgt een eerder kwalitatieve tot semi-kwantitatieve evaluatie.

Naast tests voor scenario 1 en 2 (zie eerder) werd voor genotoxiciteit ook een voorstel van tests gemaakt voor diepgaande effectevaluatie (scenario 3). De tests moeten een meer grondige evaluatie mogelijk maken van gezondheidsrisico's samenhangend met milieufactoren. Deze tests moeten toelaten om het gezondheidsrisico van veel voorkomende milieutoestanden waaraan een groot deel van de bevolking een groot deel van de tijd is blootgesteld met grotere nauwkeurigheid in te schatten.

3.3.1 Tests voor scenario 1.

Alhoewel snelle bacteriële tests als, de Vitotox[®], en Ames II tests beide zeker kwaliteiten hebben, i.h.b. hun snelheid van uitvoering, specificiteit en sensitiviteit, kunnen geen van beide tot de prioritaire tests gerekend worden en dit op basis van twee belangrijke nadelen, nl. hun kostprijs en commercieel karakter. Beide test worden inderdaad als testkit te koop aangeboden door respectievelijk de bedrijven Thermobio en Xenometrics waardoor ze, indien aanbevolen, alleen aan deze bedrijven voordeel zouden bieden. Bovendien zijn de testkits vrij duur wat hun routinematig gebruik, tenzij in de farmaceutische sector, zo goed als onmogelijk maakt. Om deze reden zal de 'klassieke' Ames test bv. zeker boven de Ames II test moeten verkozen worden ook al is deze laatste sneller. De klassieke Ames test is zeer goedkoop en kan toch nog als een snelle screeningstest worden aanzien.

De Ames test

In de eerste plaats komen de TA 98 en nitroreductase deficiënte stammen zoals TA98NR in aanmerking

Prijs van de benodigde uitrusting:

Minimale vereisten: diepvries-80°C, autoclaaf, cultuurbad en incubator. Dit is aanwezig op een normaal bacteriologisch labo.

Aanvullend: automatisch kolonie teller en LAF-kast

Werkingskosten: Voor beoordeling 1 staal: ≥75 Eur

Benodigde kwalificatie van het verantwoordelijk personeel (universitair met korte bijkomende opleiding; universitair met uitgebreide bijkomende opleiding; wetenschapper met veel ervaring terzake): universitair met korte bijkomende opleiding

Benodigde kwalificatie van het uitvoerend personeel (laboranten; laboranten met speciale opleiding): laboranten

Benodigd aantal mandagen: 1/2 mandag opzetten + 1/2 mandag voor aflezen en rapporteren van maximaal 3 stalen (voor +S9 en -S9)

Responspectrum: zeer breed. Zowel individuele organische polluenten als tal van complexe mengsels zijn reeds met succes getest met de Ames test.

Robuustheid (gevoeligheid aan verstoring door kleine variaties in de testprocedure) (robuust; gemiddeld; kwetsbaar): Robuust

Reproduceerbaarheid (intralaboratorium en interlaboratorium, beschikbaarheid van standaardprocedures, bestaan van ringtests) (zeer goed; goed; middelmatig; laag): Zeer goed

Duur van de test: 3 dagen

Relevantie van het testeindpunt t.o.v. de betreffende pathologie (de test meet een fenomeen dat een belangrijke rol speelt in het pathogenetisch mechanisme of een tussenstap is in het pathologisch gebeuren (zeer goed), goed; middelmatig; laag): Goed. De Ames test is een goede test voor het opsporen van mutagene agentia en genotoxische carcinogenen. Kan niet gebruikt worden voor het opsporen van epigenetische carcinogenen of van tumorpromotors.

Sensitiviteit in termen van het opsporen van het betreffend pathogeen effect: ongeveer 80% (detecteert echter alleen genotoxische carcinogenen)

Specificiteit in termen van het opsporen van het betreffend pathogeen effect: ongeveer 80%

Toepassing voor Lucht: Is zeer frequent toegepast

Internationale erkenning: Zeer goed

Komeettest op menselijke lymfocyten

Prijs van de benodigde uitrusting: Grootteorde van 50.000 Eur (maar is aanwezig in labo met routinematige uitvoering van deze test)

Werkingskosten: Voor beoordeling van 1 staal: Grootteorde van 150 Eur

Benodigde kwalificatie van het verantwoordelijk personeel (universitair met korte bijkomende opleiding; universitair met uitgebreide bijkomende opleiding; wetenschapper met veel ervaring terzake): universitair met uitgebreide bijkomende opleiding

Benodigde kwalificatie van het uitvoerend personeel (laboranten; laboranten met speciale opleiding): laboranten met speciale opleiding

Benodigd aantal mandagen: meerdere stalen kunnen binnen 1 mandag gemeten worden.

Responspectrum: Breed.

Robuustheid (gevoeligheid aan verstoring door kleine variaties in de testprocedure) (robuust; middelmatig; kwetsbaar): middelmatig

Reproduceerbaarheid (intralaboratorium en interlaboratorium, beschikbaarheid van standaardprocedures , bestaan van ringtests) (zeer goed; goed; middelmatig ; laag): middelmatig

Duur van de test: 1 dag

Relevantie van het testeindpunt t.o.v.de betreffende pathologie (de test meet een fenomeen dat een belangrijke rol speelt in het pathogenetisch mechanisme of een tussenstap is in het pathologisch gebeuren)(zeer goed, goed; middelmatig; laag): Goed. De Komeet test is een goede test voor het opsporen van mutagene agentia en genotoxische carcinogenen. Kan niet gebruikt worden voor het opsporen van epigenetische carcinogenen of van tumorpromotors.

Sensitiviteit in termen van het opsporen van het betreffend pathogeen effect: goed, vermoedelijk ongeveer 80%.

Specificiteit in termen van het opsporen van het betreffend pathogeen effect: goed, vermoedelijk ongeveer 80%.

Toepassing voor Lucht: Is vrij frequent toegepast

Internationale erkenning: Goed

"scrape-load-dye transfer assay" voor inhibitie van cel-cel communicatie doorheen gap-junctions (op WB-F344 rat lever epitheliale cellen)

Prijs van de benodigde uitrusting: grootte-orde van 75.000 Eur

Werkingskosten: grootte-orde van 500 Eur

Benodigde kwalificatie van het verantwoordelijk personeel (universitair met korte bijkomende opleiding; universitair met uitgebreide bijkomende opleiding; wetenschapper met veel ervaring terzake): universitair met uitgebreide bijkomende opleiding

Benodigde kwalificatie van het uitvoerend personeel(laboranten; laboranten met speciale opleiding): laboranten met speciale opleiding

Benodigd aantal mandagen: 2

Robuustheid (gevoeligheid aan verstoring door kleine variaties in de testprocedure) (robuust; gemiddeld; kwetsbaar): gemiddeld

Responspectrum: Breed

Reproduceerbaarheid (intralaboratorium en interlaboratorium, beschikbaarheid van standaardprocedures , bestaan van ringtests) (zeer goed; goed; middelmatig ; laag): goed

Duur van de test: 2 dagen

Relevantie van het testeindpunt t.o.v.de betreffende pathologie (de test meet een fenomeen dat een belangrijke rol speelt in het pathogenetisch mechanisme of een tussenstap is in het pathologisch gebeuren)(zeer goed, goed; middelmatig; laag):

Middelmatig. Er dient echter opgemerkt dat een test voor inhibitie van cel-cel communicatie wellicht de enige eenvoudige methode is om een brede waaier van epigenetische carcinogenen en tumorpromotors op te sporen, en dus een goede aanvulling is op tests voor mutagene of genotoxische effecten zoals de Ames en Komeet tests.

Sensitiviteit in termen van het opsporen van het betreffend pathogeen effect: goed voor epigenetische carcinogenen.

Specificiteit in termen van het opsporen van het betreffend pathogeen effect: goed voor epigenetische carcinogenen

Toepassing voor Lucht:

Internationale erkenning: Deze test heeft nog geen duidelijke internationale erkenning

We besluiten dat de "scrape-load-dye transfer assay" voor inhibitie van cel-cel communicatie doorheen gap-junctions een test is die goed geschikt is als test van het eerste of tweede niveau. Deze test is wellicht de enige eenvoudige methode die in aanmerking komt voor de detectie van een brede waaier van epigenetische carcinogenen en tumorpromotors en is een goede aanvulling op tests voor genotoxiciteit. Deze test kan echter alleen uitgevoerd worden in een gespecialiseerd laboratorium.

3.3.2 Tests voor scenario 2

Ames test:

zie hierboven

Komeetest:

zie hierboven

Micronucleus test op alveolaire cellen

Inleidende nota:

Klassieke cytogenetische technieken [studie van structurele chromosoom afwijkingen, zuster chromatide uitwisselingen (SCE's) en micronuclei worden als tijdrovende tests aanzien. Dit is inderdaad het geval, zeker wanneer deze test worden vergeleken met bacteriële testsystemen of met bv. de komeetest. Tegenwoordig kunnen deze klassieke tests echter in belangrijke mate in tijdsduur worden ingekort door toepassing van systemen voor beeldanalyse. Alhoewel er nog geen echt adequate beeldanalysetechnieken bestaan voor identificatie van structurele chromosoomafwijkingen (dicentrische chromosomen uitgezonderd) of het tellen van SCE's kan een automatische "metafase finder" de analysetijd reeds met meer dan de helft inkorten. Systemen voor automatisch scoren van micronuclei in binucleaire cellen zijn tegenwoordig bij machte om de tijd die nodig is voor het scoren van micronuclei tot een minimum te beperken. Alhoewel dergelijke systemen voor beeldanalyse stilaan in genetische laboratoria worden ingeburgerd zijn ze echter nog lang niet overal aanwezig. Enkele laboratoria in Vlaanderen maken er wel al gebruik van.

Prijs van de benodigde uitrusting: Grootte-orde van 75.000 Eur

Werkingskosten: Voor beoordeling van 1 staal grootte-orde van 200 Eur

Benodigde kwalificatie van het verantwoordelijk personeel (universitair met korte bijkomende opleiding; universitair met uitgebreide bijkomende opleiding; wetenschapper met veel ervaring terzake): universitair met uitgebreide bijkomende opleiding

Benodigde kwalificatie van het uitvoerend personeel(laboranten; laboranten met speciale opleiding): laboranten met speciale opleiding

Benodigd aantal mandagen: 1

Responspectrum: Breed

Robuustheid (gevoeligheid aan verstoring door kleine variaties in de testprocedure) (robuust; gemiddeld; kwetsbaar): Goed

Reproduceerbaarheid (intralaboratorium en interlaboratorium, beschikbaarheid van standaardprocedures , bestaan van ringtests) (zeer goed; goed; middelmatig ; laag): zeer goed

Duur van de test: 3 dagen

Relevantie van het testeindpunt t.o.v. de betreffende pathologie (de test meet een fenomeen dat een belangrijke rol speelt in het pathogenetisch mechanisme of een tussenstap is in het pathologisch gebeuren)(zeer goed, goed; middelmatig; laag): Zeer goed. De Micronucleus test is een goede test voor het opsporen van mutagene agentia en genotoxische carcinogenen. Kan niet gebruikt worden voor het opsporen van epigenetische carcinogenen of van tumorpromotors

Sensitiviteit in termen van het opsporen van het betreffend pathogeen effect: goed, vermoedelijk ongeveer 80%

Specificiteit in termen van het opsporen van het betreffend pathogeen effect: goed, vermoedelijk ongeveer 80%

Toepassing voor Lucht: Is reeds enkele malen toegepast

Internationale erkenning: Zeer goed

Inhibitie van gap-junctionele cel-cel communicatie
zie hierboven

3.3.3 Tests voor scenario 3

Om een enigszins volledig beeld te krijgen van de kankerverwekkende eigenschappen van de luchtverontreiniging is het nodig om naast genotoxische tests ook een test voor niet-genotoxische carcinogene effecten uit te voeren. De beste *in vitro* test is ongetwijfeld een celtransformatie test. Indien deze niet haalbaar is, en geen test voor inhibitie van cel-cel communicatie is uitgevoerd op niveau 1 of 2, is het belangrijk vooralsnog een test voor inhibitie van cel-cel communicatie uit te voeren op niveau 3.

Micronucleus test op alveolaire cellen
zie hierboven

Chromosoomaberratie test op menselijke lymfocyten

Inleidende nota:

Klassieke cytogenetische technieken [studie van structurele chromosoom afwijkingen, zuster chromatide uitwisselingen (SCE's) en micronuclei] worden als tijdrovende tests aanzien. Dit is inderdaad het geval, zeker wanneer deze test worden vergeleken met bacteriële testsystemen of met bv. de komeettest. Tegenwoordig kunnen deze klassieke tests echter in belangrijke mate in tijdsduur worden ingekort door toepassing van systemen voor beeldanalyse. Alhoewel er nog geen echt adequate beeldanalysetechnieken bestaan voor identificatie van structurele chromosoomafwijkingen (dicentrische chromosomen uitgezonderd) of het tellen van SCE's kan een automatische "metafase finder" de analysetijd reeds met meer dan de helft inkorten. Systemen voor automatisch scoren van micronuclei in binucleaire cellen zijn tegenwoordig bij machte om de tijd die nodig is voor het scoren van micronuclei tot een minimum te beperken. Alhoewel dergelijke systemen voor beeldanalyse stilaan in genetische laboratoria worden ingeburgerd zijn ze echter nog lang niet overal aanwezig. Enkele laboratoria in Vlaanderen maken er wel al gebruik van.

Waarom wordt toepassing van Fluorescente in situ Hybridisatie (FISH) technieken in de studie van chromosomale afwijkingen niet aanbevolen?

Met behulp van FISH kunnen gehele chromosomen of chromosoomgedeelten differentieel gekleurd worden waardoor bv. translocaties (het uitwisselen van chromatide stukken tussen twee chromosomen) zichtbaar worden. Dit is niet altijd het geval bij de klassieke chromosomenanalyse (egale chromosoomkleuring), i.h.b. wanneer de uitgewisselde stukken van dezelfde grootteorde zijn. Daarom wordt FISH vaak als een belangrijke aanvulling van de klassieke chromosomenanalyse gezien. Toch lijkt het niet nuttig FISH toe te passen in routineonderzoek of voor een eerste screening van milieustalen omdat translocaties (evenals dicentrische chromosomen) grotendeels ontstaan na blootstelling van cellen aan ioniserende stralen maar veel minder na blootstelling aan chemische mutagenen. Vele mutagenen induceren chromatidetype afwijkingen in 48u celculturen die niets met translocaties te maken hebben. Tegenwoordig kan FISH voor meer dan alleen de identificatie van specifieke chromosomen en chromosoomuitwisselingen toegepast worden maar dan zijn diverse kleuringen en vaak tijdrovende analyses nodig die ook niet in overeenstemming te brengen zijn met een snelle screenings- en/of routineactiviteit. De FISH technologie is bovendien ook vrij duur en dus in vele gevallen alleen daarom niet echt haalbaar. FISH is dus zeker nuttig om specifieke vragen te beantwoorden maar lijkt niet echt belangrijk in screeningsprogramma's. FISH en andere relatief tijdrovende visuele technieken voor chromosomenonderzoek hebben bovendien reeds hun beste tijd gehad want andere, nieuwere, op micro-array gebaseerde methoden beginnen thans ingang te vinden (Ashkenas, 2005). Ze zijn echter ook niet toepasbaar in de context van het milieuonderzoek dat ons hier aanbelangt, opnieuw omwille van de arbeidsintensiviteit, hoge kostprijs en hier niets terzake doende specialisme.

Prijs van de benodigde uitrusting: van de grootteorde van 100.000 Eur

Werkingskosten: van de grootteorde van 400 Eur

Benodigde kwalificatie van het verantwoordelijk personeel (universitair met korte bijkomende opleiding; universitair met uitgebreide bijkomende opleiding; wetenschapper met veel ervaring terzake): wetenschapper met veel ervaring terzake

Benodigde kwalificatie van het uitvoerend personeel(laboranten; laboranten met speciale opleiding): Laboranten met speciale opleiding

Benodigd aantal mandagen: 3

Responspectrum: Breed

Robuustheid (gevoeligheid aan verstoring door kleine variaties in de testprocedure) (robust; middelmatig; kwetsbaar): middelmatig

Reproduceerbaarheid (intralaboratorium en interlaboratorium, beschikbaarheid van standaardprocedures , bestaan van ringtests) (zeer goed; goed; middelmatig ; laag): goed

Duur van de test: 3 dagen

Relevantie van het testeindpunt t.o.v.de betreffende pathologie (de test meet een fenomeen dat een belangrijke rol speelt in het pathogenetisch mechanisme of een tussenstap is in het pathologisch gebeuren)(zeer goed, goed; middelmatig; laag): zeer goed. De Chromosoom Aberratie test is een zeer goede test voor het opsporen van mutagene agentia en genotoxische carcinogenen. Kan niet gebruikt worden voor het opsporen van epigenetische carcinogenen of van tumorpromotors.

Sensitiviteit in termen van het opsporen van het betreffend pathogeen effect: wellicht ongeveer 80%

Specificiteit in termen van het opsporen van het betreffend pathogeen effect: wellicht ongeveer 90 %

Toepassing voor Lucht: geen informatie

Internationale erkenning: Zeer goed

Transformatietest op syrian hamstert embryo cells

Prijs van de benodigde uitrusting: Grootteorde van 100.000 Eur

Werkingskosten: Grootteorde van 5.000 Eur

Benodigde kwalificatie van het verantwoordelijk personeel (universitair met korte bijkomende opleiding; universitair met uitgebreide bijkomende opleiding; wetenschapper met veel ervaring terzake): wetenschapper met veel ervaring terzake

Benodigde kwalificatie van het uitvoerend personeel(laboranten; laboranten met speciale opleiding): laboranten met speciale opleiding

Benodigd aantal mandagen: 35

Responspectrum: Breed. Zeer talrijke verschillende scheikundige stoffen werden reeds met succes onderzocht.

Robuustheid (gevoeligheid aan verstoring door kleine variaties in de testprocedure) (robuust; gemiddeld; kwetsbaar): Kwetsbaar

Reproduceerbaarheid (intralaboratorium en interlaboratorium, beschikbaarheid van standaardprocedures , bestaan van ringtests) (zeer goed; goed; middelmatig ; laag): goed

Duur van de test: 6 weken

*Relevantie van het testeindpunt t.o.v.de betreffende pathologie (de test meet een fenomeen dat een belangrijke rol speelt in het pathogenetisch mechanisme of een tussenstap is in het pathologisch gebeuren)(zeer goed, goed; middelmatig; laag): Zeer goed. Een *in vitro* transformatie test is zowel gevoelig aan genotoxische carcinogenen als aan epigenetische carcinogenen en tumorpromotors. Het is de meest relevante *in vitro* test.*

Sensitiviteit in termen van het opsporen van het betreffend pathogeen effect: 83%

Specificiteit in termen van het opsporen van het betreffend pathogeen effect: 82%

Toepassing voor Lucht: cel transformatie tests werden reeds meermaals met succes gebruikt om luchtpollutie te bestuderen

Internationale erkenning: Zeer goed

3.4 Evaluatie van tests voor immuun-respiratoire toxiciteit

Om een selectie te maken van de tests voor immuno-respiratoire toxiciteit voor verdere evaluatie werden 3 criteria gehanteerd: de gezondheidseffecten, gekende toepassingen in monitoringssysteem en randvoorwaarden van de test.

Eerst en vooral werd gekeken naar de gekende schadelijke effecten van luchtverontreiniging op het immuno-respiratoir systeem in de mens. De belangrijkste gezondheidseffecten zijn irritatie en inflammatie van de luchtwegen, allergische reacties (astma) en autoimmunititeit. Voor deze laatste zijn geen *in vitro* tests beschikbaar.

Voor het testen van inflammatie/irritatie komen *in vitro* tests gebaseerd op luchtwegeepitheelcellen en monocytën in aanmerking. De bronchiale epitheelcellijn BEAS-2B is hierbij meer relevant dan de alveolaire epitheelcellijn A549. De THP-1 cellijn is het meest aangewezen model voor monocytën. In deze cellijnen kan na blootstelling als eindpunt gekeken worden cytokine/chemokine inductie (oa il-6, il-8, TNF- α), expressie van transcriptiefactoren (oa NF κ B, AP-1) en oxidatieve stress (oa inductie van ROS). Onze keuze qua eindpunten wordt bevestigd in een uitgebreide en zeer recente EPA studie voor particulier materiaal en luchtpollutie waar analoog de mogelijkheden van *in vitro* testsystemen worden afgewogen ten opzichte van resultaten bekomen via *in vivo* effect studies (EPA, 2004).

De dendritische cellen kunnen als *in vitro* model gebruikt worden om de allergeniciteit van luchtstalen te testen. Omtrent het gebruik van de MUTZ-3 cellijn als model is de beschikbare informatie nog beperkt. De monocyt-afgeleide en CD34-afgeleide dendritische culturen zijn tot hiertoe beter gekarakteriseerd. Veranderingen in fenotype (opregulatie van membraangebonden co-stimulatoire moleculen) is momenteel het meest aangewezen eindpunt na blootstelling van de cellen.

In het Europees project HEPMEAP (QLRT-1999-01582) "Health Effects of Particles from Motor Engine Exhaust and Ambient Air Pollution" worden *in vitro* tests voor inflammatie gebruikt voor de toxicologische karakterisatie van luchtstalen. In de macrofaag cellijn RAW264.7 wordt gekeken naar il-6 productie en in de alveolaire epitheelcellijn A549 worden veranderingen in il-8 nagegaan.

In het verleden werden in Vlaanderen enkele pilootprojecten uitgevoerd in samenwerking met VMM: campagne 2000 (Industrie (Berendrecht,Zwijdrecht), landelijk (Peer,Essen), stad (Borgerhout, Antwerpen) en campagne 2001 (regio Mechelen). Voor het opsporen van inflammatoire activiteit werd il-8 en il-6 productie nagegaan in de alveolaire epitheelcellen A549. HLA-DR expressie in THP-1 cellen werd geëvalueerd om allergische responsen op te sporen.

Bij de keuze van de *in vitro* testsystemen zijn een aantal randvoorwaarden die bepalend kunnen zijn om een test al dan niet mee te nemen. De beschikbaarheid van het testsysteem is een belangrijke factor. Cellijnen zijn voor iedereen beschikbaar, terwijl men voor primaire cellen afhankelijk is van donoren. De kostprijs (media, groeifactoren, antilichamen) en de tijd van uitvoering kan sterk verschillen tussen de verschillende *in vitro* kweken en de te meten eindpunten. Voor sommige methodes zijn gespecialiseerde toestellen nodig vb flowcytometrie. De ervaring met bepaalde testsystemen kan dikwijls een voordeel zijn.

Op basis van deze criteria werd een evaluatiefiche opgesteld voor volgende tests:

Tests voor irritatie/inflammatie:

- IR-1: il-8 productie door A549
- IR-2: TNF- α productie door THP-1
- IR-4: Cytokine productie (il-6, il-8) door BEAS-2B

Test voor allergie

- IR-3: Membraan merker expressie in dendritische cellen

Deze laatste test (IR-3) scoort in de twee scenario's het laagst wat ook te verwachten was. Voor primaire dendritische cellen is er altijd de afhankelijk van bloed (navelstrengbloed of perifeer bloed). De cultuurperiode duurt langer en de test is aanzienlijk duurder. Voor screening is deze test ook niet aangewezen omdat het uitvoerend labo over een flowcytometer moet beschikken.

Code test	Evaluatiecriterium/gewichtsfactor-scenario 1								Totaal score (% van max.)
	KU	SU	RS	SR	BT	RE	TL	IE	
	2	5	5	3	4	5	3	1	
IR-1	7	5	7	3	7	7	7	5	172 (61)
IR-2	7	5	7	3	7	7	5	0	161 (58)
IR-3	3	0	10	3	3	7	5	0	127 (45)
IR-4	7	5	10	3	7	7	7	0	182 (65)

Code test	Evaluatiecriterium/gewichtsfactor-scenario 2								Totaal score (% van max.)
	KU	SU	RS	SR	BT	RE	TL	IE	
	3	1	5	4	2	5	4	4	
IR-1	7	5	7	3	7	7	7	5	170 (61)
IR-2	7	5	7	3	7	7	5	0	142 (51)
IR-3	3	0	10	3	3	7	5	0	132 (47)
IR-4	7	5	10	3	7	7	7	0	165 (59)

3.5 Evaluatie van tests voor reproductie en endocriene toxiciteit

Bij de beschrijving van ziektebeelden in relatie tot luchtpollutie (hoofdstuk 1) zijn er enkele duidelijke aanwijzingen dat bepaalde milieupolluenten mogelijk kunnen bijdragen tot een verstoring van de hormonale balans en fertiliteit, of verdergaand het voortplantingspotentieel. De problematiek omtrent hormoonverstorende stoffen is zeker niet nieuw en het voorkomen van diverse chemicaliën (organische micropolluenten van diverse stofgroepen) die interfereren met mechanismen van endocriene regulatie staat de laatste decennia in het middelpunt van de aandacht (EU 2001, IEH 1998, Damstra et al., 2002). Terwijl er voor wildpopulaties een duidelijke oorzaak-effect relatie kon aangetoond worden (Vos et al, 2000), blijkt dat de humane blootstelling aan hormoonverstorende stoffen niet eenduidig in verband kan gebracht worden met effecten als terugval van fertiliteit, toename van kankers aan geslachtsorganen. Echter vanuit het voorzorgsprincipe is er internationaal bezorgdheid omtrent de potentiële risico's van de verspreiding van deze polluenten via diverse blootstellingsroutes (EU 2001; EU 2004). Internationale organisaties betrokken in testontwikkeling van stoffen en preparaten (OECD, ICCVAM, ECVAM) leveren belangrijke inspanningen om hetzij bestaande *in vivo* tests, hetzij nieuwe *in vitro* tests met expliciet eindpunten voor reproductie- en hormoonverstoring beter te ontwikkelen en te valideren.

In het licht van deze gegevens is het daarom belangrijk om ook voor de monitoring van het compartiment lucht, een relevante screeningstest te weerhouden die potentieel hormoonverstorende stoffen kan oppikken. Interessante *in vitro* screeningstests zijn er vooral ter beschikking indien het de interferentie van stoffen met hormoonreceptoren betreft. Natuurlijk worden niet alle mechanismen van endocriene toxiciteit hiermee opgepikt, maar vanwege de complexiteit van het hormonale systeem zijn er voor indirecte pathways onvoldoende gevalideerde tests voorhanden. Deze laatste opmerking geldt in feite ook voor het luik fertiliteit en ontwikkeling. In hoofdstuk 3 worden enkele recente ontwikkelingen beschreven, maar de tests zijn niet in die fase van ontwikkeling en validatie dat ze op korte termijn inzetbaar zijn in een monitoring programma.

Er werden dus enkel voor het receptor-gerelateerde aspect voor hormoonverstoring evaluatiefiches opgesteld (bijlage 3.2.) op basis van verzamelde gegevens in een tabel in (bijlage 3.1). In de samenvattende tabel hierna worden de scores gegeven voor 3 tests die potentieel bieden in een monitoringstrategie voor lucht.

Het betreft de volgende 3 tests:

- ER-1: YES (Yeast estrogen screen), een getransformeerde gistcellijn met de humane oestrogen receptor (hEr)
- ER-2: Er-reporter systeem in een humane borstkankercellijn (bijv. MVLN, of Er-Calux)
- ER-3: proliferatie test met rat hypofyse cellijn voor testen van interferentie met T3, schildklierhormoon

De hoge score voor de gisttest (ER-1) is te wijten aan zijn robuustheid en hoge graad van toepassing voor diverse milieumatrices en polluenten die relevant zijn voor luchtpollutie. Deze gisttest laat toe om stoffen met de potentie om op de oestrogenreceptor te binden op te sporen. Dit gebeurt analoog aan de test met zoogdiercellen (ER-2) waar er diverse varianten zijn, afhankelijk van het gebruikte DNA-construct als reportersysteem en de gastheercel, die vergelijkbare performantie (bv. gevoeligheid) bieden. Voor humane applicaties zou dergelijk testsysteem meer interessant kunnen zijn, temeer er ook aanwijzingen zijn dat de permeabiliteit van het celmembraan en het metabole systeem meer

representatief zijn. Werken met zoogdiercellijnen impliceert echter een hogere kost vanwege onderhoud van celkulturen, en meer expertise.

Zoals voor detectie van de oestrogene activiteit zijn er eveneens tests die stoffen oppikken met interferentie met de receptor voor het mannelijke hormoon (androgene activiteit). Slechts een beperkt aantal studies met zowel zoogdier- als gistcellen toont dat dergelijke polluenten in lucht kunnen voorkomen. Indien er een rationele keuze moet gemaakt worden voor een kosten-efficiënte testbatterij dan verdienen tests voor androgene activiteit niet de prioriteit. Immers de uitgebreide lijst van stoffen met potentieel hormoonversturende activiteit (EU, 2001) blijkt veeleer te interfereren met het oestrogene systeem. Dit heeft in belangrijke mate te maken met de relatief lage specificiteit van de receptor voor het vrouwelijke hormoon.

Tegen de achtergrond van steeds meer ziektes die te maken hebben met verstoring van de schildklierfuncties en groei en ontwikkeling van pasgeborenen (hoofdstuk 1) vergen de meeste recente ontwikkeling voor tests naar schildklierhormoon onze aandacht. Voor dit specifieke eindpunt is er pas sinds enkele jaren meer onderzoek gepleegd, hetgeen maakt dat de testontwikkelingen nog niet zo ver gevorderd zijn. Vanwege de relevantie van de problematiek naar humane gezondheid en verspreiding van bepaalde polluenten met potentieel voor interferentie met het schildkliersysteem (gebromeerde vlamvertragers, PCB's,...) werd toch een evaluatiefiche opgesteld. De ontwikkelingen en toepassingen van deze test, fiche ER-3 moet in de nabije toekomst gevolgd worden om zijn potentieel voor milieumonitoring te evalueren.

Code test	Evaluatiecriterium/gewichtsfactor-scenario 1								Totaal score (% van max.)
	KU	SU	RS	SR	BT	RE	TL	IE	
	2	5	5	3	4	5	3	1	
ER-1	10	5	10	7	10	5	7	0	202 (72)
ER-2	7	5	5	5	7	5	3	0	141 (50)
ER-3	7	5	0VI	3	7	3	0	0	91 (32)

Code test	Evaluatiecriterium/gewichtsfactor-scenario 2								Totaal score (% van max.)
	KU	SU	RS	SR	BT	RE	TL	IE	
	3	1	5	4	2	5	4	4	
ER-1	10	5	10	7	10	5	7	0	186 (66)
ER-2	7	5	5	5	7	5	3	0	122 (43)
ER-3	7	5	0VI	3	7	3	0	0	67 (24)

4 SELECTIE VAN METHODES VOOR BEMONSTERING EN STAALVOORBEREIDING

4.1 Inleiding

Bij de selectie van een bemonstering- en extractiemethode dient men goed te weten:

- welke fractie(s) men wil bemonsteren: partikelfase (TSP, PM10, PM2.5), gasfase (semi-vluchtige, VOC's)
- welke biologische test(s) men achteraf wil uitvoeren: vereiste kwantiteit, geschikte solventen,...

De eerste effectgerichte studie van omgevingslucht (Pitts et al., 1978) rapporteerde de mutagene activiteit van organische luchtpartikelextracten in de *Salmonella* of Ames test. Sindsdien is de *Salmonella* mutageniciteit test de meeste toegepaste methode voor effectgerichte studies van omgevingslucht. De geselecteerde bemonstering- en extractiemethode is dan ook hoofdzakelijk gebaseerd op de bevindingen van deze studies (Claxton et al., 2004). De voorgestelde methode kan daardoor minder geschikt zijn voor sommige andere biologische testsystemen. Zo is b.v. gebleken dat het gebruik van PUF cartouches voor bemonstering toxische effecten veroorzaakt in de Vitotox assay (Du Four et al. 2004). Volgende paragraaf beschrijft kort een basismethode.

4.2 Bemonstering

Daar er voor effectgericht metingen relatief grote hoeveelheden staal vereist zijn is “**hoog-volume**” bemonstering het meest aangewezen en dit in combinatie met een filter/ adsorber systeem. De **filter/ adsorber** combinatie is technisch gezien de eenvoudigste en dus ook de goedkoopste methode. Hierbij worden de partikel- en de semi-vluchtige fase bemonsterd, een aanvullende adsorber(2^e) kan gebruikt worden om de meest vluchtige (bv: naftaleen) volledig te collecteren.

- Deeltjes grootte: PM10 (<10µm) of PM2.5, de kleinste deeltjes vertonen de hoogste biologische activiteit
- Filter: Quartzfilter of Teflon gecoate quartzfilters, deze laatste zouden meer geschikt zijn voor biologische metingen maar slaan gemakkelijker dicht (verstoppem).
- Adsorber: PUF en/ of XAD, beide zijn eenvoudig in gebruik en vrij goedkoop. Er zijn momenteel al cartouches op de markt die beide combineren in één unit (Caledon Laboratories, Georgetown, ON).
- Debiet: in functie van het type filter en adsorber. Een te hoog volume veroorzaakt een drukverval achter de filter wat artefacten zoals vervluchtigen veroorzaakt. Maximaal 30 m³ per uur voor een quartzfilter/ PUF adsorber combinatie.
- Duur: in functie van het te bemonsteren volume (debiet) maar maximaal 24u. En dit om artefacten zoals degradatie/ transformatie, verdamping, enz. te beperken.

Om staalname artefacten te beperken is het zeer belangrijk dat de temperatuur in de filterunit dezelfde is als de buitentemperatuur, immers een pomp die met een hoog debiet lucht

aanzuigt geeft veel warmte af. Een hoog-volume sampler vereist dus een goed geïsoleerd motorcompartiment en voldoende bescherming tegen hoge temperaturen vanwege de zon.

4.3 Staalvoorbereiding

Nog meer dan voor de bemonstering gebeurt de staalvoorbereiding in functie van het biologisch testsysteem. Algemeen zijn in omgevingslucht de organische componenten het meest biologisch actief. Om deze fractie uit de milieumatrix af te scheiden is **organische solvent extractie** de belangrijkste werkwijze.

- Methode: courante extractie methodes zijn Soxhlet, ASE (accelerated solvent extractie) of sonificatie. Terwijl ASE een snellere methode is, is de extractie-efficiëntie vrij gelijkaardig met de Soxhlet-methode.
- Solvent: solvent extractie kan met één enkel solvent, met verschillende solvents in een mengsel of in serie (sequentieel). Uit de literatuur blijkt (Claxton et al., 2004) elk systeem en elk type solvent wel zijn voor- en nadelen te hebben. Eén-solvent systemen gebruiken voornamelijk dichloromethaan (DCM), methanol of aceton. Extractie met mengsels van solvents met verschillende polariteit zullen toelaten om pollutanten met een breed spectrum van polariteit te weerhouden. Bij sequentiële extracties met solvents van polair (bijv. methanol) tot meer apolair (bijv. dichloromethaan) karakter maken het mogelijk om specifieke klassen af te zonderen, die dan in afzonderlijke fracties kunnen getest worden.
- Solvent uitwisseling: de gebruikte solvents zijn vaak toxisch voor de biologische testsystemen, daarom dient het extractiesolvent verwijderd te worden en het extract heropgelost in een niet of minder schadelijk solvent. Stalen worden meestal heropgelost in dimethyl sulfoxide (DMSO) of in ethanol. Beide solvents laten toe om een breed spectrum van stoffen in oplossing te houden. DMSO, noch ethanol blijken voor verschillende testsystemen geen toxische of biologische effecten te veroorzaken indien beneden een bepaalde concentratie van solvent gewerkt wordt (meestal lager dan 1%, maar variabel in functie van testsysteem).

4.4 Voorstel van methode

Hoog-volume	max 30m ³ /uur
Filter/ adsorber	Quartz filter of Teflon gecoate Quartz filter PUF en/of XAD
Deeltjes grootte	PM10 of kleiner
Duur	max. 24uur
Solvent extractie	Soxhlet, ASE of sonicatie
Solvent	Aceton en/of DCM

HOOFDSTUK 5

VOORSTEL VAN TESTPROTOCOL VOOR UITVOERING PILOOTPROJECT “EFFECTGERICHT METEN VAN LUCHT”

1 INLEIDING

De toepassing van effectgerichte tests in een meetnet voor milieumonitoring biedt tal van voordelen en mogelijkheden voor geïntegreerde risico-evaluatie. De voordelen van effectgericht meten ten opzichte van de klassieke stofgerichte benadering zijn ondermeer de volgende:

Het aantal stoffen, en metabolieten die zich in het milieu verspreiden is zeer uitgebreid en meestal onbekend:

- Klassieke analytische technieken sporen enkel bekende stoffen op, en schieten soms tekort qua detectiemogelijkheden indien het complexe milieumatrix betreft
- Het optreden van een schadelijk effect kan zelden beschreven worden als de som van de concentraties van voorkomende stoffen (synergistische, additieve,.. effecten)
- Effectgerichte tests kunnen als screening gehanteerd worden om verdergaand onderzoek naar enerzijds gezondheidseffecten en anderzijds bronnen van vervuiling vooraf te gaan

2 OPZET VAN EEN PILOOTPROJECT

2.1 Doel

Het doel van een pilootproject voor effectgericht meten is in eerste instantie de ontwikkeling en validatie van een meetstrategie voor Vlaanderen. In dit verband zijn volgende aspecten belangrijk

- reproduceerbare monsternamen en staalbehandelingstechnieken
- keuze van screeningstests voor toxische potentie van een breed spectrum van aanwezige agentia (particulair materiaal) en pollutanten.

Om conclusies te trekken in verband met de praktische uitvoering en de kwaliteit van de meetstrategie zal er in Vlaanderen op plaatsen met een verschillende aard van luchtpollutie meermaals per jaar een meetcampagne moeten opgezet worden met de geselecteerde batterij van tests.

Een bijkomende doelstelling is de evaluatie naar de bruikbaarheid voor opvolging van mogelijke problemen voor de gezondheid en opsporen van bronnen van vervuiling. In dit verband dient er vooral afgestemd te worden met huidige onderzoeksprojecten (Aminal, VMM,..), en meetcampagnes voor zowel effecten op humane gezondheid (biomonitoring) als op meetnetten van chemische pollutanten. Een combinatie van beschikbare info na optimale afstemming moet op langere termijn toelaten relaties te leggen tussen blootstellingsindicatoren en gezondheidseffecten en hiermee de toegevoegde waarde van een effectgericht meetnet met biologische screeningstests aan te duiden.

2.2 Aanpak

Hierna worden enkele suggesties geformuleerd qua aanpak die moeten bijdragen om tegemoet te komen aan voorgaande doelstellingen van pilootproject.

Bemonstering:

- Diversiteit qua pollutie: bijvoorbeeld stedelijk versus landelijk gebied.
- Aantal monsternamenamepunten te rationaliseren ivf beschikbare monsternametoestellen volgens zelfde principe en meer frequente monsternamename ivf seizoen (meteo) op een beperkt aantal plaatsen.
- Afstemming op bestaande meetplaatsen voor een maximum aan beschikbare meetgegevens in belang van een geïntegreerde blootstelling-effect evaluatie (chemisch, gezondheid, meteo).
- Bemonsteringsvolume (dus duur van verzamelen) af te stemmen ivf gedrag van pollutanten enerzijds en noden voor screeningstests anderzijds.

Toxiciteitstests:

- Diversiteit qua eindpunten: zie voorstel in hoofdstuk 4 voor eindpunten als genotoxiciteit, immuun-respiratoire en hormoonotoxiciteit. Voor genotoxiciteit komt een batterij van testen met de bacteriële Ames test, de micronucleus test op alveolaire cellen en de "scrape-load-dye transfer assay" voor inhibitie van cel-cel communicatie doorheen gap-junctions in aanmerking. Testen voor inflammatie/irritatie als gevolg van luchtpollutie worden bij voorkeur toegepast op luchtwegepitheelcellen en monocytten. Na blootstelling zijn cytokine/chemokine inductie (oa il-6, il-8, TNF- α), expressie van transcriptiefactoren (oa NF κ B, AP-1) en oxidatieve stress (oa inductie van ROS) de meest relevante eindpunten. Voor het meten van xeno-oestrogene activiteit wordt een gisttest aanbevolen.
- Een test voor cytotoxiciteit (algemeen celdood), ter ondersteuning van de voorgaande tests en een test voor opsporen van endotoxines (mogelijke interferend bij milieustalen) is vereist.
- Relevantie nagaan om hetzij op extracten, hetzij op partikels of op beiden een screening te verrichten.
- Herhaalbaarheid van tests op basis van meerdere monsternames verspreid over de verschillende seizoenen draagt bij tot de validatie van de methoden.

Integratie en bruikbaarheid:

- Procedure opstellen om gemeten signalen te interpreteren ivf kritische waarden (bijv. toxiciteitsequivalenten tov een positieve controle).
- Screening van toxiciteit kaderen ten opzichte van beschikbare meetgegevens.
- Bruikbaarheid van meetnet aantonen voor a) bronidentificatie na TIE-onderzoek, b) nood voor verdergaand gezondheidsonderzoek of c) opvolging van succes van genomen reductiemaatregelen rond milieupollutie.

HOOFDSTUK 6

REFERENTIES

Aardema, M.J., Isfort, R.J., Thompson, E.D., LeBoeuf R.A. (1996). The low pH Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation assay: a revitalized role in carcinogen prediction. *Mutat Res*, 356(1): 5-9.

Agopyan, N., Bhatti, T., Yu, S., Simon, A. (2003). Vanilloid receptor activation by 2- and 10- μ m particles induces responses leading to apoptosis in human airway epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 192(1): 21-35.

Akagi, T., Hanafusa, H., (2004). Human diploid fibroblasts are refractory to oncogene-mediated transformation. *Cell cycle* 3(3): 257-258.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D., (1994) *Molecular biology of the cell*, Garland Publ. Inc. blz 243.

Alexander, F.E., Pathea, I.S.L., Biondi, A., Brandalise, S., Cabrera, M.E., Chan, L.C., Chen, Z., Cimino, G., Cordoba, J.C., Gu, L.J., Hussein, H., Ishii, E., Kamel, A.M., Labra, S., Magalhaes, I.Q., Mizutani, S., Petridou, E., de Oliveira, M.P., Yuen, P., Wiemels, J.L., Greaves, M.F. (2001). Transplacental chemical exposure and risk of infant leukemia with MLL gene fusion. *Cancer Res*. 15:61(6): 2542-2546.

Ali, M.M., Mathur, N., Chandra, S.V. (1990). Effects of chronic cadmium exposure on locomotor behaviour of rats. *Indian J. Exp. Biol.* 28: 653-656.

Ali, M.M., Shukla, G.S., Srivastava, R.S., Mathur, N., Chandra, S.V. (1993). Effects of vitamine E on cadmium induced locomotor dysfunctions in rats. *Vet. Hum. Toxicol.* 35: 109-111.

Allermann, L., Poulsen, O.M. (2002). Interleukin-8 secretion from monocytic cell lines for evaluation of the inflammatory potential of organic dust. *Environmental Research* 88(3): 188-198.

Ames, B.N., Lee, F.D., Durston, W.E. (1973). An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 70: 782-786.

Andersen, H.R., Andersen, A-M., Arnold, S.F., Autrup, H., Barfoed, M., Beresford, N.A., Bjerregaard, P., Christiansen, L.B., Gissel, B., Hummel, R., Jørgensen, E.B., Korsgaard, B., Le Guevel, R., Leffers, H., McLachlan, J., Møller, A., Nielsen, J.B., Olea, N., Oles-Karasko, A., Pakdel, F., Pedersen, K.L., Perez, P., Skakkeboek, N.E., Sonnenschein, C., Soto, A.M., Sumpter, J.P., Thorpe, S.M., Grandjean, P. (1999). Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspective Supplements* 107: S1.

Anderson, H.R., Bremner, S.A., Atkinson, R.W., Harrison, R.M., Walters, S. (2001). Particulate matter and daily mortality and hospital admissions in the west midlands conurbation of the United Kingdom: associations with fine and coarse particles, black smoke and sulphate. *Occup. Environ. Med.* 58(8): 504-510.

Armitage P. (1985) Multistage models of carcinogenesis, *Environ. Health. Perspect*, 63: 195-201.

Arsalane, K., Broeckaert, F., Knoop, B., Clippe, A., Buchet, J.P., Bernard, A. (1999). Increased serum and urinary concentrations of lung clara cell protein in rats acutely exposed to ozone. *Toxicology And Applied Pharmacology* 159(3): 169-174

Ashby J; Tennant R.W. (1991). Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP. *Mutation research* 257(3): 229-306.

Ashkenas, J. (2005). Cytogenetics embrace molecular karyotyping. *The Scientist* 19: 33.

Aufderheide M., Knebel J.W. and Ritter D (2002) A method for the *in vitro* exposure of human cells to environmental and complex gaseous mixtures: application to various types of atmosphere. *ATLA* 30, 432-441

Aufderheide M., Knebel J.W., Ritter D (2003) An improved *in vitro* model for testing the pulmonary toxicity of complex mixtures such as cigarette smoke. *Exp Toxic Pathol* 55: 51–57

Avol, E.L., Gauderman, W.J., Tan, S.M., London, S.J., Peters, J.M. (2001). Respiratory effects of relocating to areas of differing air pollution levels. *Am J Respir Crit Care Med.* 1;164(11): 2067-2072.

Ayagari, V.N., Januszkiewicz, A., Nath, J. (2004). Pro-inflammatory responses of human bronchial epithelial cells to acute nitrogen dioxide exposure. *Toxicology* 197(2): 149-164.

Babich, H., Borenfreund, E. (1990) Applications of the neutral red cytotoxicity assay to *in vitro* toxicology (Review). *Alternatives to Laboratory Animals* 18: 129-144.

Baccarelli, A. (1999). Occupational agents and endocrine function: an update of the experimental and human evidence. *Med. Lav.* 90(5): 650-670.

Ball, B.R., Smith, K.R., Veranth, J.M., Aust, A.E. (2000). Bioavailability of iron from coal fly ash: mechanisms of mobilization and of biological effects. *Inhalation Toxicology* 12(4): 209-225.

Balls, M. (2004). Progressing toward the reduction, refinement and replacement of laboratory animal procedures: thoughts on some encounters with Dr Iain Purchase. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA* 18(2): 165-170.

Baranova, H.; Bothorishvilli, R.; Canis, M.; Albuissou, E., Perriot, S., Glowaczower, E., Bruhat, M.A.; Baranov, V., Malet, P. (1997). Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism and susceptibility to endometriosis in a French population. *Mol. Hum. Reprod. Sep*; 3(9): 775-780.

Barbone F., Bovenzi M., Cavallieri F., Stanta, G. (1995). Air pollution and lung cancer in Trieste, Italy. *Am J Epidemiol* 141(12):1161-1169.

Bayram, H., Devalia, J.L., Sapsford, R.J., Ohtoshi, T., Miyabara, Y., Sagai, M., Davies, R.J. (1998). The effect of diesel exhaust particles on cell function and release of inflammatory mediators from human bronchial epithelial cells *in vitro*. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 18(3): 441-448.

Bebok, Z., Varga, K., Hicks, J.K., Venglarik, C.J., Kovacs, T., Chen, L., Hardiman, K.M., Collawn, J.F., Sorscher, E.J., Matalon et al. (2002). Reactive oxygen nitrogen species decrease cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and cAMP-mediated Cl⁻ secretion in airway epithelial. *The Journal Of Biological Chemistry* 277(45): 43041-43049.

Becker, S., Soukup, J.M., Gilmour, M.I., Devlin, R.B. (1996). Stimulation of human and rat alveolar macrophages by urban air particulates: effects on oxidant radical generation and cytokine production. *Toxicology and Applied Pharmacology* 141(2): 637-648.

Becker, S., Soukup, J.M. (1998). Decreased CD11b expression, phagocytosis, and oxidative burst in urban particulate pollution-exposed human monocytes and alveolar macrophages. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 55(7): 455-477.

Behrendt, H., Kasche, A., Ebner von Eschenbach, C., Risse, U., Huss Marp, J., Ring, J. (2001). Secretion of proinflammatory eicosanoid-like substances precedes allergen release from pollen grains in the initiation of allergic sensitization. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 124(1-3): 121-5.

Bellocq, A., Azoulay, E., Marullo, S., Flahault, A., Fouqueray, B., Philippe, C., Cadranet, J., Baud, L. (1999). Reactive oxygen and nitrogen intermediates increase transforming growth factor-beta1 release from human epithelial alveolar cells through two different mechanisms. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 21(1): 128-136.

- Benigni, R., Zito, R. (2004). The second National Toxicology Program comparative exercise on the prediction of rodent carcinogenicity: definitive results. *Mutation research* 566 (1): 49-63.
- Bernard, A., Hermans, C., Van Houte, G. (1997). Transient increase of serum Clara cell protein (CC16) after exposure to smoke. *Occupational And Environmental Medicine* 54(1): 63-65.
- Bertazzi P.A., Consonni D., Bachetti S., Rubagotti M., Baccarelli A., Zocchetti C., Pesatori A.C. (2001). *Am. J. Epidemiol.* 153(11): 1031-44
- Bertram, J.S. (1985). Neoplastic transformation in cell cultures: in-vitro/in-vivo correlations. *IARC Sci Publ* 67: 77-91.
- Berwald, Y., Sachs, L. (1965). *In vitro* transformation of normal cells to tumor cells by carcinogenic hydrocarbons. *Journal of the National Cancer Institute* 35(4): 641-661.
- Bigazzi, P.E. (1999). Metals and Kidney Autoimmunity. *Environ. Health Perspect.* 107: 753-765.
- Biggeri, A., Barbone F., Lagazio, C., Bovenzi, M., Stanta, G. (1996). Air pollution and lung cancer in Trieste, Italy: spatial analysis of risk as a function of distance from sources. *Environ. Health Perspect.* 104(7): 750-754)
- Bihl, M., Tamm, M., Nauck, M., Wieland, H., Perruchoud, A.P., Roth, M. (1998). Proliferation of human non-small-cell lung cancer cell lines: role of interleukin-6. *American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology* 19(4): 606-612
- Billings, P.C., Heidelberger, C., Landolph, J.R. (1995). S-9 metabolic activation enhances aflatoxin-mediated transformation of C3H/10T1/2 cells. *Toxicology and applied pharmacology* 77(1): 58-65.
- Binkova, B., Cerna, M., Pastorkova, A., Jelinek, R., Benes, I., Novak, J., Sram, R.J. (2003). Biological activities of organic compounds adsorbed onto ambient air particles: comparison between the cities of Teplic and Prague during the summer and winter seasons 2000-2001. *Mutation Research* 525: 43-59
- Birnbaum, L.S., Fenton, S.E. (2003). Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors. *Environ. Health Perspect.* 111(4): 389-394.
- Bjerknes, M. (1996). Expansion of mutant stem cell populations in the human colon. *J. Theor. Biol.* 178(4): 381-385.
- Blackburn, W.D.Jr. (1997). Eosinophilia myalgia syndrome. *Semin. Arthritis Rheum.* 26: 788-793.
- Blomberg, A., Mundway, I., Svensson, M., Hagenbjörk-Gustafsson, A., Thomasson, I., Helleday, R., Dumont, X., Forsberg, B., Nordberg, G., Bernard, A. (2003). Clara cell protein as a biomarker for ozone-induced lung injury in humans. *The European Respiratory Journal* 22(6): 883-888.
- Boardman, K.C., Aryal, A.M., Miller, W.M., Water, C.M. (2004). Actin re-distribution in response to hydrogen peroxide in airway epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology* 199(1): 57-66.
- Bobak, M., Leon, D.A.(1999). The Effect of Air Pollution on Infant Mortality Appears Specific for Respiratory Causes in the Postneonatal Period. *Epidemiology* 10: 666-670.
- Boekelheide et al. (1997) (eds.). Reproductive and endocrine toxicology in series of Comprehensive toxicology. Pergamon press 10: 761.
- Boland, S., Bonvallot, V., Fournier, T., Baeza-Squiban, A., Aubier, M., Marano, F. (2000). Mechanisms of GM-CSF increase by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *American Journal of Physiology* 278(1): L25-L32.
- Boland S., Baeza-Squiban, A., Bonvallot, V., Houcine, O., Pain, C., Meyer M., Marano, F. (2001). Similar cellular effects induced by diesel exhaust particles from a representative diesel vehicle recovered from filters and Standard Reference Material 1650. *Toxicology in vitro* 15: 379-385.

Bömmel H., Haake, M., Luft, P., Horejs-Hoeck, J., Hein, H., Bartels, J., Schauer, C., Pöschl, U., Kracht, M., Duschl, A. (2003). The diesel exhaust component pyrene induces expression of IL-8 but not of eotaxin. *International Immunopharmacology* 3(10-11): 1371-1379.

Bonefeld-Jørgensen E.C., Andersen, H.R., Rasmussen, T.H., Vinggaard, A-M. (2001). Effect of highly bioaccumulated polychlorinated biphenyl congeners on estrogen and androgen receptor activity. *Toxicology* 158: 141-153.

Bonvallot, V., Baeza-Squiban, A., Baulig, A., Brulant, S., Boland, S., Muzeau F., Barouki, R., Marano, F. (2001). Organic compounds from diesel exhaust particles elicit a proinflammatory response in human airway epithelial cells and induce cytochrome p450 1A1 expression. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 25(4): 515-521.

Borenfreund, E., Puerner, J.A. (1986). Cytotoxicity of metals, metal-metal and metal-chelator combinations assay *in vitro*. *Toxicology* 39: 121-134.

Boyd, J.A., Barrett, J.C. (1990). Genetic and cellular basis of multistep carcinogenesis. *Pharmacol. Ther.* 46(3): 469-486.

Brinton, L.A., Gridley, G., Persson, I., Baron, J., Bergqvist, A. (1997). Cancer risk after a hospital discharge diagnosis of endometriosis. *Am. J. Obstet Gynecol.* Mar; 176(3): 572-579.

Brouillard, F., Bouthier, M., Leclerc, T., Clement, A., Baudouin-Legros, M., Edelman, A. (2001). NF-kappa B mediates up-regulation of CFTR gene expression in Calu-3 cells by interleukin-1beta. *J. Biol. Chem.* 276(12): 9486-9491.

Brouwer, A., Morse, D.C., Lans, M.C., Schuur, A.G., Murk, A.J., Klasson-Wehler, E., Bergman, A., Visser T.H. (1998). Interactions of persistent environmental organohalogenes with the thyroid hormone system: mechanism and possible consequences for animal and human health. *Toxicol. Ind. Health* 14: 59-84.

Brown, D.M., Stone, V., Findlay, P., MacNee, W., Donaldson, K. (2000). Increased inflammation and intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is independent of transition metals or other soluble components. *Occupational And Environmental Medicine* 57(10): 685-691

Brown, D.M., Donaldson, K., Borm, P.J., Schins, R.P., Dehnhardt, M., Gilmour, P., Jiminez, L.A., Stone, V. (2004). Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *American Journal of Physiology* 286(2): L344-L353.

Bunger, J. Krahl, J., Baum, K., Schroder, O., Muller, M., Westphal, G., Ruhnau, P., Schulz, T.G., Hallier, E. (2000). Cytotoxic and mutagenic effects, particle size and concentration analysis of diesel engine emissions using biodiesel and petrol diesel as fuel. *Arch. Toxicol.* 74(8): 490-498.

Bunn, H.J., Dinsdale, D., Smith, T., Grigg, J. (2001). Ultrafine particles in alveolar macrophages from normal children. *Thorax.* 56(12): 932-934.

Burvall, K., Palmberg, L., Larsson, K. (2004). Influence of 8-bromo-cyclicAMP on interleukin -6 and -8 mRNA levels in A549 human lung epithelial cells exposed to organic dust: A time-kinetic study. *Life Sciences* 75(23): 2733-2749.

Cahill, P., Knight, A., Billinton, N., Baker, M., Walsh, L., Keenan, Williams, P., Tweats, C.D., Walmsley, R. (2004). The GreenScreen® genotoxicity assay: a validation programme. *Mutagenesis*, 19: 105-119.

Calcabrini, A., Meschini, S., Marra, M. Falzano, L., Colone, M., De Berardis, B., Paoletti, L., Arancia, G., Fiorentini, C. (2004). Fine environmental particulate engenders alterations in human lung epithelial A549 cells. *Environmental Research* 95(1): 82-91.

- Calderon Garciduenas L., Mora Tiscareno A., Fordham L.A., Valencia Salazar G., Chung C.J., Rodriguez Alcaraz A., Paredes R., Variakojis D., Villarreal Calderon A., Flores Camacho L., Antunez Solis A., Henriquez Roldan C., Hazucha M.J. (2003). Respiratory damage in children exposed to urban pollution. *Pediatr Pulmonol.* 36(2): 148-61.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N. E. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years [see comments]. *Br. Med J.* 305: 609-613.
- Canfield, R.L., Henderson, C.R. Jr, Cory-Slechta, D.A., Cox, C., Jusko, T.A., Lanphear, B.P. (2003). Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microg per deciliter. *N Engl J Med.* 17;348(16): 1517-1526
- Carstensen, J.M., Pershagen, G., Eklund, G. (19 Smoking-adjusted incidence of lung cancer among Swedish men in different occupations. *Int J Epidemiol.* 1988 Dec;17(4):753-8.
- Carter, J.D., Ghio, A.J., Samet, J.M., Devlin, R.B. (1997). Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal-dependent. *Toxicology and Applied Pharmacology* 146(2): 180-188.
- Chang, L.W. (1995). Mercury Neurotoxicity: effects and mechanisms. In Chang LW, Dyer RS, eds. *Handbook of Neurotoxicology.* Marcel Dekker, Inc. NY: 31-59.
- Chauhan, V., Breznan, D., Goegan, P., Nadeau, D., Karthikeyan, S., Brook, J.R., Vincent, R. (2004). Effects of ambient air particles on nitric oxide production in macrophage cell lines. *Cell Biology and Toxicology* 20(4): 221-239.
- Chellat, F., Grandjean-Laquerriere, A., Naour, R.L., Richard L., Fernandes, J. Yahia, L'H., Guenounou, M., Laurent-Maquin, D. (2005). Metalloproteinase and cytokine production by THP-1 macrophages following exposure to chitosan-DNA nanoparticles. *Biomaterials* 26(9): 961-970.
- Cheng, M-D., Malone, B., Storey J.M.E. (2003). Monitoring cellular responses of engine-emitted particles by using a direct air-cell interface deposition technique. *Chemosphere* 53(3): 237-243.
- Choy, W.N (2001). Genotoxic and non-genotoxic mechanisms of carcinogenesis. In *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment* (ed. W.N. Choy) 47-72. New York, NY, USA: Marcel Dekker.
- Cislaghi C., Nimis P.L. (1997). Lichens, air pollution and lung cancer. *Nature* 387(6632): 463-464.
- Clancy, L., Goodman, P., Sinclair, H., Dockerey, W. (2002). Effect of air pollution control on death rates in Dublin, Ireland: an intervention study. *The Lancet*, 360: 1210-1214.
- Claxton, L.D., Matthews, P.P., Warren, S.H. (2004). The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: *Salmonella mutagenicity.* *Mutat. Res.*567(2-3): 347-399.
- Clements, J., (2000). The Mouse Lymphoma Assay. *Mutat. Res.* 455: 97-110.
- Clive, D., Flamm, W., Machesko, M., Bernheim, N. (1972). A mutational assay using the thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells. *Mutat. Res* 16: 77-87.
- Cobellis, L., Latini, G., De Felice, C., Razzi, S., Paris, I., Ruggieri, F., Mazzeo, P., Petraglia, F. (2003). High plasma concentrations of di-(2-ethylhexyl)-phthalate in women with endometriosis. *Hum. Reprod.* 18: 1512-1515.
- Cole, J., Atlett, C., Green, M., Lowe, J., Muriel, W. (1983). A comparison of the agar cloning and microtitration techniques for assaying cell survival and mutation frequency in L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutat. Res.* 111: 371-386.
- Combes, R., Balls, M., Curren, R., Fischbach, M., Fusenig, N., Kirkland, D.C., Lasne, J., L., LeBoeuf, R., Marquardt, H., McCormick J., Müller, L., Rivedal, E., Sabbioni, E., Tanaka, N., Vasseur, P.,

- Yamasaki H. (1999). Cell transformation assays as predictors of human carcinogenicity. The report and recommendations of ECVAM Workshop 39. *ATLA* 27: 745-767.
- Combes, R.D. (2000). Endocrine disruptors- a critical review of *in vitro* and *in vivo* testing strategies for assessing their toxic hazard to humans. *ATLA* 28: 81-118.
- Covaci, A., Koppen, G., Van Cleuvenbergen, R. et al. (2001). Persistent organochlorine compounds in human serum of 50-65 years old women living in two regions of Flanders, Belgium. *Organohalogen Compounds* 52: 265-268.
- Cowan, M.J., Huang, X., Yao, X.L., Schelhamer, J.H. (2000). Tumor necrosis factor alpha stimulation of human Clara cell secretory protein production by human airway epithelial cells. *Annals Of The New York Academy of Sciences* 923: 193-201.
- Cowley, E., Linsdell, P. (2002). Oxidant stress stimulates anion secretion from the human airway epithelial cell line Calu-3: implications for cystic fibrosis lung disease. *The Journal of Physiology* 543(1): 201-209.
- Cowley, E.A. (2003). Isoprostane-mediated secretion from human airway epithelial cells. *Molecular Pharmacology* 64(2):298-307.
- Crespi, C., Thilly, W. (1984). Assay for gene mutation in a human lymphoblast line, AHH-1, competent for xenobiotic metabolism. *Mutat. Res.* 128: 221-230.
- Crespi, C., Gonzalez, D., Steimel, D., Turner, T., Gelboin, H., Penman, B., Langenbach, R. (1991). Aetabolically competent human cell line expressing five cDNAs encoding procarcingen-activating enzymes: application to mutagenicity testing, *Chem. Res. Toxicol.* 4: 566-572.
- Crestani, B., Aubier, M., (1998). Inflammatory role of alveolar epithelial cells. *Kidney International* 53: 88-93.
- Cummings, A., Metcalf, J., Birnbaum, L. (1996). Promotion of endometriosis by 2,3,4,7,8 tetrachloro-p-dioxin in rats and mice: time-dose dependence and species comparison. *Toxicology and Applied Pharmacology* 138: 131-139.
- Damstra, T., Barlow, S., Bergman, A., Kavlock, R., Van der Kraak, G. (editors) (2002). Global assessment of the state of the science of endocrine disruptors. International programme of chemical safety. WHO/IPCS/EDC/02.2: 180
- Davies, R., Crespi, C., Rudo, K., Turner, T., Langenbach, R. (1989). Development of a human cell line by selection and drug-metabolizing gene transfection with increased capacity to activate promutagens. *Carcinogenesis* 10: 885-891.
- De Hollander, A.E.M., Melse, J.M., Lebret, E., Kramers, P.G.N. (1999). An aggregate public health indicator to represent the impact of multiple environmental exposures. *Epidemiology* 10: 606-617.
- De Smedt, A.C.A., Van Den Heuvel, R.L., Van Tendeloo, V.F.I., Berneman, Z.N., Schoeters, G.E.R., Weber, E., Tuschl, H (2002). Phenotypic alterations and IL-1beta production in CD34(+) progenitor- and monocyte-derived dendritic cells after exposure to allergens: a comparative analysis. *Archives Of Dermatological Research* 294(3): 109-116.
- Den Hond, E., Roels, H. A., Hoppenbrouwers, K., Nawrot, T., Thijs, L., Vandermeulen, C., Winneke, G., Vanderschueren, D., Staessen, J. A. (2002). Sexual maturation in relation to polychlorinated aromatic hydrocarbons: Sharpe and Skakkebaek's hypothesis revisited. *Environ. Health Perspect.* 110: 771-776.
- Dhooge, W., Kaufman, J. M., Comhaire, F. (2001). Delayed sexual development in adolescents [letter]. *Lancet* 358: 1816-1817.

Dick, C.A.J., Stone, V., Brown, D.M., Watt, M., Cherrie, J.W., Howarth, S., Seaton, A., Donaldson, K. (2000). Toxic and inflammatory effects of filters frequently used for the collection of airborne particulate matter. *Atmospheric Environment* 34: 2587-2592.

Dick, C.A., Dennekamp, M., Howarth, S., Cherrie, J.W., Seaton, A., Donaldson, K., Stone, V (2001). Stimulation of IL-8 release from epithelial cells by gas cooker PM(10): a pilot study. *Occup Environ Med.* 58(3): 208-210.

Dockery, D.W., Pope, C.A. III, Xiping, X., Spengler, J.D., Ware, J.H., Fay, M.A., Ferries, B.G. Jr, Speizer, F.E. (1993). An association between air pollution and mortality in six US cities. *N. Engl J Med*, 329: 1753-1759.

Dolk, H., Vrijheid, M., Armstrong, B., Abramsky, L., Bianchi, F., Garne, E., Nelen, V., Robert, E., Scott, J.E., Stone, D., Tenconi, R. (1998). Risk of congenital anomalies near hazardous-waste landfill sites in Europe: the EUROHAZCON study. *Lancet* 8;352(9126): 423-427

Donaldson, K., Stone, V., Seaton, A., MacNee, W. .et al. (2001). Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potential mechanisms. *Environ Health Perspect* 2001, 109, 4: 523-527.

Don Porto Carero, A., Hoet, P.H., Verschaeve, L., Schoeters, G., Nemery, B. (2001). Genotoxic effects of carbon black particles, diesel exhaust particles, and urban air particulates and their extracts on a human alveolar epithelial cell line (A549) and a human monocytic cell line (THP-1). *Environmental And Molecular Mutagenesis* 37(2): 155-163.

Don Porto Carero, A., Hoet, P.H.M., Nemery, B., Schoeters, G. (2002). Increased HLA-DR expression after exposure of human monocytic cells to air particulates. *Clinical and Experimental Allergy* 32(2): 296-300.

Dreyer, L., Winther, J.F., Pukkala, E., Andersen, A. (1997). Avoidable cancers in the Nordic countries. Tobacco smoking. *APMIS Suppl.* 1997;76: 9-47.

Du Four, V.A., Van Larebeke, N., Janssen, C.R. (2004). Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples in Flanders, Belgium. *Mutat. Res.* 558(1-2): 155-167.

Dunkel, V.C., Rogers, C., Swierenga, S.H., Brillinger, R.L., Gilman, J.P., Nestmann, E.R. (1991). Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories: III. Cell transformation in C3H/10T1/2 mouse embryo cell, BALB/c 3T3 mouse fibroblast and Syrian hamster embryo cell cultures. *Mutation research* 246(2): 285-300.

Dybdahl, M., Risom, L., Bornhold, J., Autrup, H., Loft, S., Wallin, H. (2004). Inflammatory and genotoxic effects of diesel particles *in vitro* and *in vivo*. *Mutation Research* 562(1-2): 119-131.

ECVAM (2004). database *in vitro* testprotocols: Scientific Information Service on advanced alternative methods to animal experiments in biomedical sciences (http://ecvam-sis.jrc.it/cover/index_registration.html)

Ehrenberg, L., Granath, F., Tornqvist, M. (1996). Macromolecule adducts as biomarkers of exposure to environmental mutagens in human populations. *Environ Health Perspect.* 104(3): 423-428.

Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B.J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes S., Lhuguenot, J.C., Pieters, R., Kleiner, J. (2002). Methods of *in vitro* toxicology. *Food and chemical toxicology* 40: 193-236.

Elms, J., Beckett, P.N., Griffin P., Curran, A.D. (2001). Mechanisms of isocyanate sensitisation. An *in vitro* approach. *Toxicology in vitro* 15(6): 631-634.

Engelhardt, G., Schwind, K.R., Mussler, B. (2004). The testing of chemicals in the Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation assay for assessment of carcinogenic potential. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA* 18(2): 213-188

England, G., Toby, B., Zielinska, B. (1998). Critical review of source sampling and analysis methodologies for characterizing organic aerosols and fine particulate source emission profiles. American Petroleum Institute report, API No. 344.

Eskenazi, B., Warner, M.L. (1997). Epidemiology of endometriosis. *Obstet-Gynecol-Clin-North-Am.* 24(2): 235-258.

EU (2001). Mededeling van de Commissie aan de Raad en het Europees Parlement over de tenuitvoerlegging van de communautaire strategie voor hormoonontregelaars – een groep stoffen waarvan vermoed wordt dat ze de hormoonhuishouding van mensen en in het wild levende dieren ontregelen (COM(1999)706), Brussel juni 2001.

EU (2004). Commission staff working document on implementation of the Community Strategy for Endocrine disrupters - a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife (Com (1999)706). Brussels 28/10/2004; SEC(204)1372: 53.

EPA - Air Quality Criteria for Particulate Matter. Volume II of II. (2004). EPA/600/P-99002bF

Fahy, O., Tsiopoulos, A., Hammad, H., Peltel, J., Tonnel, A.B., Wallaert, B. (1999). Effects of diesel organic extracts on chemokine production by peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 103(6): 1115-1124.

Fahy, O., Hammad, H., Sénéchal, S., Pestel, J., Tonnel, A.B., Wallaert, B., Tsiopoulos, A. (2000). Synergistic effect of diesel organic extracts and allergen Der p 1 on the release of chemokines by peripheral blood mononuclear cells from allergic subjects: involvement of the map kinase pathway. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 23(2): 247-254.

Feldman, R.G. (1999). Occupational and environmental neurotoxicology. Lippicott-Raven Publishers: Philadelphia.

Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E. (2003). Human Micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res.* 10;534(1-2): 45-64.

Feychting, M., Svensson, D., Ahlbom, A. (1998). Exposure to motor vehicle exhaust and childhood cancer. *Scand J Work Environ Health.* 24(1): 8-11

Fialkow P.J. (1976). Clonal origin of human tumors. *Biochim Biophys Acta* 458 (3): 283-321

Figa-Talamanca, I., Carbone, P., Lauria, L., Spinelli, A., Ulizzi, L. (2003). Environmental factors and the proportion of males at birth in Italy. *Arch. Environ. Health,* 58: 119-124.

Friedman, M.S., Powell, K.E., Hutwagner L., Graham L.M., Teague W.G. (2001). Impact of changes in transportation and commuting behaviors during the 1996 Summer Olympic Games in Atlanta on air quality and childhood asthma. *JAMA.* 285(7): 897-905.

Freudenheim, J.L., Marshall, J.R. (1988). The problem of profound mismeasurement and the power of epidemiological studies of diet and cancer. *Nutr Cancer.* 11(4): 243-250.

Frye C., Hoelscher, B., Cyrus, J., Wjst M., Wichmann, H.E., Heinrich, J.G.S.F (2003). Association of lung function with declining ambient air pollution. *Environ Health Perspect.* 111(3): 383-387.

Fujii, T., Hayashi, S., Hogg, J. C., Mukae, H., Suwa, T., Goto, Y., Vincent, R., van Eeden, S. F. (2002). Interaction of Alveolar Macrophages and Airway Epithelial Cells Following Exposure to Particulate Matter Produces Mediators that Stimulate the Bone Marrow, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 27(1): 34-41.

Furuta C., Suzuki A., Taneda S., Kamata K., Hayashi H., Mori Y., Li C., Watanabe G., Taya K. (2004). Estrogenic activities of nitrophenols in diesel exhaust particles. *Biology of reproduction* 70: 1527-1533

- Galbraith, G.M., Pandey, J.P., Schmidt, M.G., Arnaud, P., Goust, J.M. (1996). Tumor necrosis factor alpha gene expression in human monocytic THP-1 cells exposed to beryllium. *Archives of Environmental Health* 51(1): 29-33.
- Gauvin, S., Le Moullec Y., Bremont F., Momas, I., Balducci, F., Ciognard, F., Poilve, M.P., Zmirou, D. (2001). Relationships between nitrogen dioxide personal exposure and ambient air monitoring measurements among children in three French metropolitan areas: VESTA study. *Arch. Environ. Health* 56(4): 336-341.
- Gerhard, I., Monga, B., Krahe, J., & Runnebaum, B. (1999). Chlorinated hydrocarbons in infertile women. *Environ. Res.*, 80: 299-310.
- Gioldassi, X.M., Papadimitriou, H., Mikraki, V., Karamanos, N.K. (2004). Clara cell secretory protein : determination of serum levels by an enzyme immunoassay and its importance as an indicator of bronchial asthma in children. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 34 : 823-826.
- Glue, C., Millner, A., Bodtger, U., Jinquan T., Poulsen, L. K. (2002). *In vitro* effects of monophthalates on cytokine expression in the monocytic cell line THP-1 and in peripheral blood mononuclear cells from allergic and non-allergic donors. *Toxicology in vitro* 16(6): 657-662
- Glowala, M., Mazurek, A., Piddubnyak, V., Fiszer-Kierzkowska, A., Michalska, J., Krawczyk, Z. (2002). HSP70 overexpression increases resistance of V79 cells to cytotoxicity of airborne pollutants, but does not protect the mitotic spindle against damage caused by airborne toxins. *Toxicology*. 25,170(3): 211-219.
- Golub, M.S., Hogrefe, C.E., Germann, S.L., Jerome, C.P. (2004). Endocrine disruption in adolescence: immunologic, hematologic and bone effects in monkeys. *Toxicol. Sci.* 82(2): 598-607.
- Gorba T., Allsopp T.E. (2003). Pharmacological potential of embryonic cells. *Pharmacological research* 47: 269-278.
- Gordon T., Gerber H., Fang C.P., et al. (1999). A centrifugal particle concentrator for use in inhalation toxicology. *Inhalation Toxicology* 11 (1): 71-87.
- Grandjean, P., Budtz-Jorgensen, E., Keiding, N., Weihe, P. (2003). Underestimation of risk due to exposure misclassification. The Precautionary Principle: Implications for Research and Prevention in Environmental & Occupational Health. Euro. Ramazzini Foundation, Euro. J. Oncology, Library, 2, Bologna.
- Gribaldo, L., Bueren, J., Deldar, A., Hokland, P., Meredith, C., Moneta, D., Monesso, P., Parchment, R., Parent-Massin, D., Pessina, A., Schoeters G. (1996). The use of *in vitro* systems for evaluating hematotoxicity. *ATLA*, 24: 211-231.
- Gutleb, A.C., Meerts, H.A.T.M., Bergsma, J.H., Schriks, M., Murk A.J. (2005). T-screen as a tool to identify thyroid hormone receptor active compounds. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19(2): 231-238.
- Hajas, G., Zsiros, E., László, T., Hajdú, P., Somodi, S., Réthi, B., Gogolák, P., Ludányi, K., Panyi, G., Rajnavölgyi et al. (2004). New phenotypic, functional and electrophysiological characteristics of KG-1 cells. *Immunology Letters* 92(1-2): 97-106.
- Hamadeh, H.K., Bushel, P.R., Jayadev, S., DiSorbo, O., Bennett, L., Li, L. Tennant, R., Stoll, R., Barrett, J.C., Paules, R.S., Blanchard, K., Afshari, C.A. (2002). Prediction of compound signature using high density gene expression profiling. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* 67(2): 232-240.
- Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R., Bullock, P. (2004). Comparison of alamar blue and MTT assays for high throughput screening. *Toxicol In vitro*. 18(5): 703-710.

- Han, C.Z., Guo, Y., Jing, J.X. (1995). A study on the relationship between malignant tumour mortality and environmental pollution in Beicun countryside of Datong City] *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*.16(2): 101-104.
- Hansen, L.A., Poulsen, O.M., Würtz, H. (1999). Endotoxin potency in the A549 lung epithelial cell bioassay and the limulus amebocyte lysate assay. *Journal of Immunological Methods* 226(1-2): 49-58.
- Hart, R.P., Rose, C.S., Hamer, R.M. (1989). Neuropsychological effects of occupational exposure to cadmium. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 11: 933-943.
- Hartung, T., Bremer, S., Casati, S., Coecke, S., Corvi, R., Fortaner, S., Gibrardo, L., Halder, M., Roi, A., Prieto, P., Sabbioni, E., Worth, A., Zuang, V. (2003). Ecvam's response to the changing political environment for alternatives: consequences for the European Union chemicals and cosmetics policies. *ATLA* 31: 473-481.
- Hartwig, A., Dally, H., Schlepegrell, R. (1996). Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: use of the bacterial Fpg protein in combination with alkaline unwinding. *Toxicol Lett.* 88(1-3):85-90.
- Heddle, J.A. (1999). On clonal expansion and its effects on mutant frequencies, mutation spectra and statistics for somatic mutations *in vivo*. *Mutagenesis* 14(3): 257-60.
- Heddle, J.A. (1999). Commentary. Mutant manifestation: the time factor in somatic mutagenesis. *Mutagenesis* 14: 1-3.
- Heinrich, J., Hoelscher, B., Frye, C., Meyer, I., Pitz M. Cyrus J., Wjst, M., Neas, L., Wichmann, H.E. (2002). Improved air quality in reunified Germany and decreases in respiratory symptoms. *Epidemiology* 13(4): 394-401.
- Helzlsouer, K.J., Huang, H.Y., Strickland, P.T., Hoffman, S., Alberg, A.J., Comstock, G.W., Bell, D.A. (1998). Association between CYP17 polymorphisms and the development of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 7(10):945-949.
- Hemminki, K., Pershagen, G. (1994). Cancer risk of air pollution: epidemiological evidence. *Environ Health Perspect.* 102(4): 187-192.
- Hetland, R. B., Myhre, O., Låg, M. Hongve, D., Schwarze P. E., Refsnes, M. (2001). Importance of soluble metals and reactive oxygen species for cytokine release induced by mineral particles. *Toxicology* 165(2-3): 133-144.
- Hetland, R.B, Cassee, F.R., Refsnes, M., Schwarze, P.E., Låg, M., Boere, A.J.F., Dybing, E. (2004). Release of inflammatory cytokines, cell toxicity and apoptosis in epithelial lung cells after exposure to ambient air particles of different size fractions. *Toxicology in vitro* 18(2): 203-212.
- Hilts, S.R. (2003). Effect of smelter emission reductions on children's blood lead levels. *Sci Total Environ.* 303(1-2): 51-58.
- Hiura, T.S., Kaszubowski, M.P., Li, N., Nel, A.E. (1999). Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. *Journal of Immunology* 163(10): 5582-5591.
- Hoek, G, Brunekreef, B., Goldbohm, S., Fischer, P, Van den Brandt, P.A. (2002). Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in the Netherlands: a cohort study. *The Lancet*, 360: 1203-1209.
- Holmes, P., Humfrey, C., Scullion, M., Taylor M. (1998). Appraisal of test methods for sex-hormone disrupting chemicals capable of affecting the reproductive process. MRC Institute for Environment and Health, UK department Environment, Transport and the Regions.

- Horak, F. Jr; Studnicka, M., Gartner, C., Spengler, J.D., Tauber, E. Urbanek, R., Veiter, A. Frischer, T (2002). Particulate matter and lung function growth in children: a 3-yr follow-up study in Austrian schoolchildren. *Eur. Respir. J.* 19(5): 838-45
- Houtman, X.J., Cenijn, P.H., Hamers, T., Lamoree, M.H., Legler, J., Murk, A.J., Brouwer A. (2004). Toxicological profiling of sediments using *in vitro* bioassays, with emphasis on endocrine disruption. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 32-40.
- Hrubá, F., Fabianová, E., Koppová, K., Vandenberg, J.J. (2001). Childhood respiratory symptoms, hospital admissions, and long-term exposure to airborne particulate matter. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 11(1): 33-40
- Hsiao, W.L., Mo, Z.Y., Fang, M., Shi, X.M., Wang, F. (2000). Cytotoxicity of PM(2.5) and PM(2.5-10) ambient air pollutants assessed by the MTT and the Comet assays. *Mutat Res.* 20, 471(1-2): 45-55.
- Huang, S-L., Hsu, M.K., Chan, C-C. (2003). Effects of submicrometer particle compositions on cytokine production and lipid peroxidation of human bronchial epithelial cells. *Environmental Health Perspectives* 111(4): 478-482.
- Huang, X-L., Pawliczak, R., Yao, X-L. Cowan, M.J., Gladwin, M.T., Walter M.J., Holtzman, M.J., Madara, P., Logun, C., Shelhamer, J.H. (2003). Interferon-gamma induces p11 gene and protein expression in human epithelial cells through interferon-gamma-activated sequences in the p11 promoter. *The Journal of Biological Chemistry* 278(11): 9298-9308.
- Hukkanen J., Pelkonen, O., Hakkola, J., Raunio, H. (2002). Expression and Regulation of Xenobiotic-Metabolizing Cytochrome P450 (CYP) Enzymes in Human Lung. *Critical Reviews in Toxicology* 32(5): 391-411.
- Hulette, B.A., Ryan, C.A., Gerberick, G.F. (2002). Elucidating changes in surface marker expression of dendritic cells following chemical allergen treatment. *Toxicology And Applied Pharmacology* 182(3): 226-233
- Hung, C.H., Zhang, Z., Chowdhury, B., Plunkett, B.A., Huang, S.K. (2004). A novel role of the pulmonary Clara cell secretory 10 kD protein (CC10) in the regulation of T-cell responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113(2): S210.
- Hung, C-H., Chen, L-C., Zhang, Z., Chowdhury, B., Lee, W.L., Plunkett, B., Chen, C-H., Meyers, A.C., Huang, S-K. (2004). Regulation of T_H2 responses by the pulmonary Clara cell secretory 10-kd protein. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114(3): 664-670.
- Huttunen, K., Hyvärinen, A., Nevalainen, A., Komulainen, H., Hirvonen, M-R. (2003). Production of proinflammatory mediators by indoor air bacteria and fungal spores in mouse and human cell lines. *Environmental Health Perspectives* 111(1): 85-92.
- ICCVAM (2004). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods For Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays (<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/endocrine.htm>)
- ICH (2004). Guidelines reproductive toxicology: S5A: Detection of Toxicity to reproduction for Medical Products S5B(M): An Addendum on Toxicity to Male Fertility (Amended Guideline).
- IEH (1998). Appraisal of test methods for sex hormone disrupting chemicals capable of affecting the reproductive process. MRC Institute for Environment and Health for the UK department of Environment, Transport and the Regions, UK.
- Ikeda, M., Zhang, Z.W., Shimbo, S., Watanabe, T., Nakatsuka, H., Moon C.S., Matsuda-Inoguchi, N., Higashikawa, K. (2000). Urban population exposure to lead and cadmium in east and south-east Asia. *Sci. Total Environ.* 17(1-3): 373-384.

- Ingalls, T.H., Clustering of multiple sclerosis in Galton, Ohio, 1982-1985 (1989). *Am. J. Forensic med. Pathol.* 10: 213-215.
- Isfort, R.J., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A. (1996). Comparison of the standard and reduced pH Syrian hamster embryo (SHE) cell *in vitro* transformation assays in predicting the carcinogenic potential of chemicals. *Mutation research* 356(1): 11-63.
- Ishii, H., Fujii, T., Hogg, J.C., Hayashi, S., Mukae, H., Vincent, R., van Edden, S.F. (2004). Contribution of IL-1 beta and TNF-alpha to the initiation of the peripheral lung response to atmospheric particulates (PM10). *American Journal of Physiology* 287(1): L176-L183.
- Ito, Y., Sato, S., Son, M., Kondo, M., Kume, H., Takagi, K., Yamaki, K. (2002). Bisphenol A inhibits Cl⁻ secretion by inhibition of basolateral K⁺ conductance in human airway epithelial cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 302(1): 80-87.
- Janic, B., Umstead, T.M., Phelps, D.S., Floros, J. (2003). An *in vitro* cell model system for the study of the effects of ozone and other gaseous agents on phagocytic cells. *Journal Of Immunological Methods* 272(1-2): 125-130.
- Janssens, A.R., Stevens, W.J., Empsten, F.E., Bridts, C.H., De Clerck, L.S. (1999). Voorkomen van astma, rhinitis en atopisch eczeem bij schoolgaande kinderen en hun familieleden. *T. Geneesk.* 55: 491-495.
- Jarrell, J., Gocmen, A., Foster, W., Brant, R., Chan, S., Sevcik, M. (1998). Evaluation of reproductive outcomes in women inadvertently exposed to hexachlorobenzene in southeastern Turkey in the 1950s. *Reprod Toxicol.* 12: 469-476.
- Jarrell, J. F., Gocmen, A., Akyol, D., Brant, R. (2002). Hexachlorobenzene exposure and the proportion of male births in Turkey 1935-1990. *Reprod Toxicol.* 16: 65-70.
- Jaspers, I., Flescher, E., Chen, L.C. (1997). Ozone-induced IL-8 expression and transcription factor binding in respiratory epithelial cells. *The American Journal of Physiology* 272(3): L504-L511.
- Jaspers, I., Chen, L.C., Flescher, E. (1998). Induction of interleukin-8 by ozone is mediated by tyrosine kinase and protein kinase A, but not by protein kinase C. *Journal of Cellular Physiology* 177(2): 313-323.
- Jedrychowski W., Whyatt R.M., Camann D.E., Bawle U.V., Peki K., Spengler J.D., Dumyahn T.S., Penar A., Perera F.F. (2003). Effect of prenatal PAH exposure on birth outcomes and neurocognitive development in a cohort of newborns in Poland. Study design and preliminary ambient data. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.* 16(1): 21-29.
- Jedrychowski, W., Maugeri, U., Jedrychowska-Bianchi, I. (2002). Body growth rate in preadolescent children and outdoor air quality. *Environ. Res.* 90(1): 12-20.
- Jiménez, L.A., Drost, E.M., Gilmour, P.S., Rahman, I., Antonicelli, F., Ritchie, H., MacNee, W., Donaldson, K. (2002). PM(10)-exposed macrophages stimulate a proinflammatory response in lung epithelial cells via TNF-alpha. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 282(2): L237-L248.
- Johnson, K.L., Cummings, A.M., Birnbaum, L.S. (1997). Promotion of endometriosis in mice by polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls. *Environ. Health Perspect.* 105(7): 750-755.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J. (1981). *Functionele histology.* Wetenschappelijke uitgeverij Bunge, Utrecht.
- Kado, N., Langley, D., Eisenstadt, E. (1983). A simple modification of the *Salmonella* liquid incubation assay: increased sensitivity for detecting mutagens in human urine, *Mutat. Res.* 122: 25-32.

- Kakunaga, T. (1985). Critical review of the use of established cell lines for in-vitro cell transformation. IARC Sci Publ, 67: 55-73.
- Kakunaga, T., Yamasaki, H. (1985). Recommendations for experimental protocols and for scoring transformed foci in BALB/C 3T3 and C3H 10T1/2 cell transformation. IARC Scientific Publications N) 67, IARC, Lyon 1985.
- Kalra, V.K., Ying, Y., Deemer, K., Natarajan, R., Nadler, J.L., Coates, T.D. (1994). Mechanism of cigarette smoke condensate induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells. Journal Of Cellular Physiology 160(1): 154-162.
- Karami-Tehrani, F., Salami, S., Mokarram, P. (2001). Competition of tamoxifen with thyroxine for TBG binding: ligand binding assay and computational model. Clin. Biochem. 34: 603-606.
- Karol, M. (1998). Target organs and systems: methodologies to assess immune system function. Environ Health Perspect 106 (2).
- Katsouyanni, K., Touloumi, G., Samoli, E., Gryparis, A., Le Tertre, A., Monopolis, Y. (2001). Confounding and effect modification in the short-term effects of ambient particles on total mortality: results from 29 European cities within the APHEA2 project, Epidemiology, 12(5): 521-531.
- Kaufman, L.D., Izquierdo, M.M., Serrano, J.M., Gomez-Reino, J.J. (1995). 12-year follow-up study of epidemic Spanish toxic oil syndrome. J. Rheumatol. 22: 282-288.
- Kawagishi, C., Kurosaka, K., Watanabe, N., Kobayashi, Y. (2001). Cytokine production by macrophages in association with phagocytosis of etoposide-treated P388 cells *in vitro* and *in vivo*. Biochimica Et Biophysica Acta,1541(3): 221-230.
- Kawaguchi, M., Kokubu, F., Odaka, M., Watanabe, S., Suzuki, S., Ieki, K., Matsukura, S., Kurokawa, M., Adachi, M., Huang et al (2004). Induction of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by a new cytokine, ML-1 (IL-17F), via Raf I-MEK-ERK pathway. The Journal Of Allergy And Clinical Immunology 114(2): 444-450.
- Kawasaki, S., Takizawa, H., Takami, K., Desaki, M., Okazaki, H., Kasama, T., Kobayashi, K., Yamamoto, K., Nakahara, K., Tanaka, M., Sagai, M., Ohtoshi, T. (2001). Benzene-extracted components are important for the major activity of diesel exhaust particles: effect on interleukin-8 gene expression in human bronchial epithelial cells. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 24(4): 419-426.
- Kennedy, T., Ghio A.J., Reed, W., Samet, J., Zagorski, J. Quay, J., Carter, J., Daily, L., Hoidal, J.R., Devlin, R.B. (1998). Copper-dependent inflammation and nuclear factor-kappaB activation by particulate air pollution. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 19(3): 366-378.
- Kerckaert G.A., Isfort R.J., Carr G.J., Aardema M.J., LeBoeuf R.A. (1996). A comprehensive protocol for conducting the Syrian hamster embryo cell transformation assay at pH 6.70. Mutat. Res., 356 (1): 65-84
- Kim, J., Sanders, S., Plitt, J., Pardoli, D., Chen, L., Schleimer, R. (2004). Modulation of expression of B7 homologs by human rhinovirus and double-stranded RNA in airway epithelial cells *in vitro* and *in vivo*. Journal of Allergy and Clinical Immunology 113(2): S247.
- King, C., Brennan, S., Thompson, P.J., Stewart, G.A. (1998). Dust mite proteolytic allergens induce cytokine release from cultured airway epithelium. Journal of Immunology 161(7): 3645-3651.
- Kirsch-Volders, M., Fenech, M. (2001). Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. Mutagenesis 16(1):51-58
- Kleinman, M.T., Sioutas, C., Chang, M.C., Boere, A.J.F. Cassee, F.R.(2003). Ambient fine and coarse particle suppression of alveolar macrophage functions. Toxicology Letters 137(3): 151-158.

- Klestadt, D., Laval-Gilly, P., Foucaud L., Falla, J. (2004). Modification of membrane markers on THP-1 cells after ozone exposure in the presence or absence of fMLP. *Toxicology in vitro* 18(3): 279-283.
- Ko, J.C., Bailey, J.E., Pablo, L.S., Heaton-Jones, T.G. (1996). Comparison of sedative and cardiorespiratory effects of medetomidine and medetomidine-butorphanol combination in dogs. *Am J Vet Res.* 57(4): 535-540.
- Koenig, J.Q. (1999). Air pollution and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104: 717-722.
- Kolskowsky, A., Pilarczyk, M., Namiesnik, J. (2000). Denudation- a convenient method of isolation and enrichment of analytes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 32 (4): 301-335.
- Koninckx, P.R., Braet, P., Kennedy, S.H., Barlow, D.H. (1994). Dioxin pollution and endometriosis in Belgium. *Hum-Reprod.* Jun; 9(6): 1001-1002.
- Konishi, K., Tanabe, F., Taniguchi, M., Yamauchi, H., Tanimoto, T., Ikeda, M., Orita, K., Kurimoto, M.(1997). A simple and sensitive bioassay for the detection of human interleukin-18/interferon-gamma-inducing factor using human myelomonocytic KG-1 cells *Journal Of Immunological Methods* 209(2): 187-191.
- Koppen, G., Covaci, A., Van Cleuvenbergen, R. et al. (2002). Persistent organochlorine pollutants in human serum of 50-65 years old women in the Flanders Environmental and Health Study (FLEHS). Part 1: Concentrations and regional differences. *Chemosphere* 48: 811-825.
- Korobowicz, E., Kwasniewska, A., Robak, J. (1995). Clinical and morphological analysis of endometriosis in women of the Lublin Macroregion between 1987 and 1992. *Pol-J-Pathol.* 46(3): 191-194.
- Krakauer, T. (2000). Pentoxifylline inhibits ICAM-1 expression and chemokine production induced by proinflammatory cytokines in human pulmonary epithelial cells. *Immunopharmacology* 46(3): 253-261.
- Krewski, D., Burnett, R.R., Goldberg, M.S. et al. (2000). Reanalysis of the Harvard Six Cities Study and the American Cancer Society Study of Particulate Air Pollution and Mortality. Health Effects Institute, Boston.
- Kristovich, R., Knight, D.A., Long, J.F., Williams, M.V., Dutta, P.K., Waldman, J. (2004). Macrophage-Mediated Endothelial Inflammatory Responses to Airborne Particulates: Impact of Particulate Physicochemical Properties. *Chem. Res. Toxicol.* 17(10): 1303-1312.
- Krogenaes, A.K., Nafstad, I., Skäre, J.U., Farstad, W., Hafne, A.L. (1998). *In vitro* reproductive toxicity of polychlorinated biphenyl congeners 153 and 126. *Reproductive Toxicology* 12 (6), 575-580.
- Krumschnabel, G., Nawaz, M. (2004). Acute toxicity of hexavalent chromium in isolated teleost hepatocytes. *Aquat Toxicol.* 18, 70(2): 159-167.
- Krunkosky, T.M., Martin, L.D., Fischer, B.M., Voynow, J.A., Adler, K.B. (2003). Effects of TNFalpha on expression of ICAM-1 in human airway epithelial cells *in vitro*: oxidant-mediated pathways and transcription factors. *Free Radical Biology & Medicine* 35(9): 1158-1167.
- Kuroki, T., Sasaki K. (1985). Relationship between in-vitro cell transformation and in-vivo carcinogenesis based on available data on the effects of chemicals. *IARC Sci Publ* 67: 93-118.
- Kurosaka, K., Watanabe, N; Kobayashi, Y. (2001). Production of proinflammatory cytokines by resident tissue macrophages after phagocytosis of apoptotic cells. *Cellular Immunology* 211(1): 1-7.
- Kvale, G., Bjelke, E., Heuch, I. (1986). Occupational exposure and lung cancer risk. *Int J Cancer.* 15;37(2): 185-193.

- Kwong, K.Y.C., Literat, A., Zhu, N.L., Huang, H.H. Li, C., Jones, C.A. Minoo, P. (2004). Expression of transforming growth factor beta (TGF-beta1) in human epithelial alveolar cells: a pro-inflammatory mediator independent pathway. *Life Sciences* 74(24): 2941-2957.
- Lambré, C., Aufderheide, M., Bolton R.E., Fubini, B., Haagsman, H.P., Hext, P.M., Jorissen, M., Landry, Y., Morin, J.P., Nemmery, B., Nettesheim, P., Pauluhn, J., Richards, R.J., Vickers, A., Wu, R. (1996). *In vitro* tests for respiratory toxicity. The Report and Recommendations of ECVAM workshop 18. *ATLA* 24: 671-681.
- Landolph, J.R. (1985). Chemical transformation in C3H 10T1/2 Cl 8 mouse embryo fibroblasts: historical background, assessment of the transformation assay, and evolution and optimization of the transformation assay protocol. *IARC Sci Publ.* 67: 185-203.
- Lang, D.S., Jörres, R.A., Mücke, M., Siegfried, W., Magnussen, H. (1998). Interactions between human bronchoepithelial cells and lung fibroblasts after ozone exposure *in vitro*. *Toxicology Letters*: 96-97: 13-24.
- Langer, P., Tajtakova, M., Guretzki, H. J., Kocan, A., Petrik, J., Chovancova, J., Drobna, B., Jursa, S., Pavuk, M., Trnovec, T., Sebkova, E., Klimes, I. (2002). High prevalence of anti-glutamic acid decarboxylase (anti-GAD) antibodies in employees at a polychlorinated biphenyl production factory. *Arch. Environ. Health* 57: 412-415.
- Larini, A., Bocci, V. (2005). Effects of ozone on isolated peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology in vitro* 19: 55-61.
- Lebel, G., Dodin, S., Ayotte, P., Marcoux, S., Ferron, L., Dewailly, E. (1998). Organochlorine exposure and risk of endometriosis. *Fertility and Sterility* 69: 221-228.
- LeBoeuf, R.A., Kerckaert, K.A., Aardema, M.J., Isfort, R.J. (1999). Use of Syrian hamster embryo and BALB/c 3T3 cell transformation for assessing the carcinogenic potential of chemicals. *IARC scientific publications* 146: 409-425.
- LeBoeuf R.A., Kerchaert G.A. (1987). Enhanced morphological transformation of early passage Syrian hamster embryo cells cultured in medium with a reduced bicarbonate concentration and pH. *Carcinogenesis* 8(5): 689-897.
- Lehmann, I., Rehwagen, M., Diez, U., Seiffart, A., Rolle Kampczyk, U., Richter, M., Wetzig, H., Borte, M., Herbarth, O. (2001). Enhanced *in vivo* IgE production and T cell polarization towards the type 2 phenotype in association with indoor exposure to VOC: results of the LARS study. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 204(4): 211-221
- Li, H., Jin, S., Shi, S. (1994). The trend of mortality of lung cancer and its association with air pollution. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 15(1): 38-41.
- Li, D., Zhang, W., Sahin, A.A., Hittelman, W.N. (1999). DNA adducts in normal tissue adjacent to breast cancer: a review. *Cancer Detect Prev.* 23(6): 454-62.
- Li, N., Wang, M., Oberley, T.D., Sempf, J.M., Nel, A.E. (2002). Comparison of the pro-oxidative and proinflammatory effects of organic diesel exhaust particle chemicals in bronchial epithelial cells and macrophages. *Journal of Immunology* 169(8): 4531-4541.
- Lipscomb, M.F., Masten, B.J. (2002). Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiological reviews* 82: 97-130.
- Little, F.F., Cruikshank, W.W., Center, D.M. (2001). IL-9 stimulates release of chemotactic factors from human bronchial epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 25(3): 347-352.
- Loffing, J., Moyer, B.D., Reynolds, D., Stanton, B.A. (1999). PBA increases CFTR expression but at high doses inhibits Cl(-) secretion in Calu-3 airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 277(4): L700-L708.

- Madden, M.C., Smith, J.P., Daily, L.A., Friedman, M. (1994). Polarized release of lipid mediators derived from phospholipase A2 activity in a human bronchial cell line. *Prostaglandins* 48(3): 197-215.
- Marano, F., Boland, S., Bonvallot, V., Baulig, A., Baeza-Squiban, A. (2002). Human airway epithelial cells in culture for studying the molecular mechanisms of the inflammatory response triggered by diesel exhaust particles. *Cell Biology and Toxicology* 18(5): 315-320.
- Maron, D., Ames, B.N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.* 113: 173-215.
- Martuzzi, M., Di Tanno, N. D., Bertollini, R. (2001). Declining trends of male proportion at birth in Europe. *Arch. Environ. Health* 56: 358-364.
- Masterson, A.J., Sombroek, C.C., De Grujil, T.D., Graus, Y.M.F. van der Vliet, H.J.J., Lougheed, S.M., van den Eertwegh, A.J.M., Pinedo, H.M., Scheper, R.J. (2002). MUTZ-3, a human cell line model for the cytokine-induced differentiation of dendritic cells from CD34+ precursors. *Blood* 100(2): 701-703.
- Matthews (1993a). Transformation of BALB/c-3T3 cells: I. Investigation of experimental parameters that influence detection of spontaneous transformation. *Environ Health Perspect*, 101(2): 277-291.
- Matthews (1993b). Transformation of BALB/c-3T3 cells: II. Investigation of experimental parameters that influence detection of benzo[a]pyrene-induced transformation. *Environ Health Perspect*, 101(2): 293-310.
- Matthews (1993c). Transformation of BALB/c-3T3 cells: III. Development of a co-culture clonal survival assay for quantification of chemical cytotoxicity in high-density cell cultures. (eng; includes abstract) *Environ Health Perspect*, 101(2): 311-318.
- Matthews (1993d) Transformation of BALB/c-3T3 cells: IV. Rank-ordered potency of 24 chemical responses detected in a sensitive new assay procedure. *Environ Health Perspect*, 101(2): 319-345.
- Matthews (1993e). Transformation of BALB/c-3T3 cells: V. Transformation responses of 168 chemicals compared with mutagenicity in Salmonella and carcinogenicity in rodent bioassays., *Environ Health Perspect*, 101(2): 347-482.
- Mathiesen, M., Pedersen, E.K., Bjørseth, O., Syversen, T. (2004). Emissions from indoor dust inhibit proliferation of A549 cells and TNFalpha release from stimulated PBMCs. *Environment International* 30(5): 651-657.
- Mayani, A., Barel, S., Soback, S., Almagor, M. (1997). Dioxin concentrations in women with endometriosis. *Hum-Reprod.* 12(2): 373-375.
- Mayo, J.J., Kohlhepp, P., Zhang, D., Winzerling, J.J. (2004). Effects of sham air and cigarette smoke on A549 lung cells: implications for iron-mediated oxidative damage. *American Journal of Physiology* 286(4): L866-L876.
- McConnell, R., Berhane, K., Gilliland, F., London, S.J., Islam, T., Gauderman, W.J., Avol, E., Margolis, H.G., Peters, J.M (2002). Asthma in exercising children exposed to ozone: a cohort study. *Lancet.* 359(9304): 386-391
- McCormick, J.J., Maher, V.M. (1994). Analysis of the multistep process of carcinogenesis using human fibroblasts. *Risk. Anal.*, 14(3): 257-263.
- McNeilly, J. D., Heal, M.R., Beverland, I.J., Howe, A., Gibson, M.D., Hibbs, L.R., MacNee, W., Donaldson, K. (2004). Soluble transition metals cause the pro-inflammatory effects of welding fumes *in vitro*. *Toxicology And Applied Pharmacology* 196(1): 95-107.
- McDow, S.R. (1999). Sampling artefacts errors in gas/particle partitioning measurements. In: Lane, D.A. (Ed.), *Gas and Particle Phase Measurements of Atmospheric Organic compounds*, advances in

- environmental, industrial, and process control technologies. Gordon and Breach, Amsterdam, 2: 105-126.
- Meek, M.D. (1998). Ah receptor and estrogen receptor-dependent modulation of gene expression by extracts of diesel exhaust particles. *Environmental Research* 79: 114-121.
- Meerts, I.A.T.M., Zander, J.J., Luijckx, E.A.C., Van Leeuwen-Bol, I., Marsch, G., Jakobsson, E., Bergman, A., Brouwer A. (2000). Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin *in vitro*. *Toxicological Sciences* 56: 95-104.
- Meerts I.A.T.M., Letcher, R.J., Hoving, S., Marsch, G., Bergman, A., Lemmen, J. G., Van der Burg, B., Brouwer A. (2001). *In vitro* estrogenicity of polybrominated diphenylethers, hydroxylated PBDEs and polybrominated bisphenol A compounds. *Environm. Health Perspect.* 109(4): 399-407.
- Mendelsohn, A.L., Dreyer, B.P., Fierman, A.H., Rosen, C.M., Legano, L.A., Kruger, H.A., Lim, S.W., Barasch, S., Au, L., Courtlandt, C.D. (1999). Low-level lead exposure and cognitive development in early childhood. *J Dev Behav Pediatr* 20:425-431.
- Minder, B., Das-Smaal, E.A., Orlebeke, J.F. (1998). Cognition in children does not suffer from very low lead exposure. *J. Learn Disabil* 31:494-502.
- MIRA (2000). Gevolgen voor de menselijke gezondheid. Hoofdstuk in MIRA scenario rapport, auteurs: N. van Larebeke, F. Comhaire, C. Cornelis, M. De Broe, J. Deman, I. D'Haese, P. D'Haese, W. Dhooge, G. Eggermont, G. Koppen, H. Mol, G. Schoeters, W. Stevens, R. Torfs, H. Vanmarcke, P. Vermeire, M. Viaene, en andere achtergronddocumenten (ter beschikking bij de VMM).
- Mitchell, S. A., Marino, S. A. Brenner, D. J., Hall E.(2004). Bystander effect and adaptive response in C3H 10TK cells INT. *J. Radat. Biol.* 80(7): 465-472.
- Moen, M.H., Schei, B. (1997) Epidemiology of endometriosis in a Norwegian county. *Acta-Obstet-Gynecol-Scand.* Jul; 76(6): 559-562.
- Molenberghs, G., Cuypers, C., Goetghebeur, E.J., Passchier, W.F., Pieters, J. (2003) Comment on Sexual maturation in relation to polychlorinated aromatic hydrocarbons: Sharpe and Skakkebaek's hypothesis revisited. *Environ. Health Perspect.*, 111: A202.
- Monn, C., Becker, S. (1999). Cytotoxicity and Induction of Proinflammatory Cytokines from Human Monocytes Exposed to Fine (PM_{2.5}) and Coarse Particles (PM_{10-2.5}) in Outdoor and Indoor Air. *Toxicology and Applied Pharmacology* 155(3): 245-252.
- Morimoto, Y., Ding, L., Oyabu, T., Hirohashi, M., Kim, H., Ogami, A., Yamato, H., Akiyama, I., Hori, H., Higashi, T., Tanaka, I. (2003). Expression of Clara cell secretory protein in the lungs of rats exposed to silicon carbide whisker *in vivo*. *Toxicology letters* 145: 273-279.
- Mortelmans, K., Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay, *Mutat. Res.* 455: 29-60.
- Moshhammer, H., Neuberger, M. (2003). The active surface of suspended particles as a predictor of lung function and pulmonary symptoms in Austrian school children. *Atmospheric Environment* 37: 1737-1744.
- Muinich Keizer, S. & M. Mul, D. (2001). Trends in pubertal development in Europe. *Hum. Reprod Update.* 7: 287-291.
- Munger, R., Isacson, P., Hu, S., Burns, T., Hanson, J., Lynch, C.F., Cherryholmes, K., Van Dorpe, P., Hausler, W.J., Jr. (1997). Intrauterine growth retardation in Iowa communities with herbicide-contaminated drinking water supplies. *Environ. Health Perspect.* 105: 308-314.
- Murphy, V.A. (1997). Cadmium: Acute and chronic neurological disorders. In: Yasui M, Strong MJ, Ota K, Verity MA, eds. *Mineral and metal: Neurotoxicology*. Boca Raton: CRC Press Inc. 229-240.

- Musiol, A., Szyrocka-Szwed, K., Wojczuk, J., Kudybka, A. (1981). Evaluation of the neurological state and EEG investigations in workers with occupational exposure to cadmium. *Wiad Lek* 34: 1615-1620.
- Muthumbi, W., De Boever, P., D'Haese, I., D'Hooge, W., Top, E.M., Pieters, J.G., Comhaire F., Verstraete, W. (2003). Assessment of the estrogenic activity of flue gases from burning processes by means of the yeast based human estrogen receptor (hER) bioassay. *Environ. Technol.* 23(3): 287-291
- Muthumbi, W., De Boever, P., Pieters, J.G., Sicialiano, S., D'Hooge, W. Verstraete, W. (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and estrogenic compounds in experimental flue gas streams. *J. Environm. Qual.* 32 : 417-422
- Nam, H.Y., Choi, B.H., Lee, J.Y., Lee, S.G., Kim, Y.H., Lee, K.H., Yoon, H.K., Song, J.S., Kim, H.J., Lim, Y. (2004). The role of nitric oxide in the particulate matter (PM_{2.5})-induced NFκB activation in lung epithelial cells. *Toxicology Letters* 148(1-2): 95-102.
- Nemmar, A., Vanbilloen, H., Hoylaerts, M.F., Hoet, P.H., Verbruggen, A., Nemery, B. (2001). Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164(9): 1665-1668.
- Nemmar, A., Hoet, P.H.M., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M.F., Vanbilloen, H., Mortelmans, L., Nemery, B. (2002a). Passage of Inhaled Particles in to the Blood Circulation in Humans. *Circulation* 105: 411-414.
- Nemmar, A., Hoylaerts, M.F., Hoet, P.H., Dinsdale, D., Smith, T., Xu, H. et al. (2002b). Ultrafine particles affect experimental thrombosis in an *in vivo* hamster model. *Am J Respir Crit Care Med.* 166(7): 998-1004.
- Nemmar, A., Hoet, P., Dinsdale, D., Vermeulen, J., Hoylaerts, M.F., Nemery, B. (2003). Diesel exhaust particles in lung acutely enhance experimental peripheral thrombosis *Circulation* 107: 1202-1208.
- Newbold, R.F. (1985). Malignant transformation of mammalian cells in culture: delineation of stages and role of cellular oncogene activation. *IARC Sci Publ* 67: 31-53.
- Newbold, R.F. (2002). The significance of telomerase activation and cellular immortalization in human cancer. *Mutagenesis* 17(6): 539-550.
- Nicod, L.P., Cochand, L., Donatus, D. (2000). Antigen presentation in the lung: dendritic cells and macrophages. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 17: 246-255
- Noda, M., Wataha, J.C., Lockwood, P.E., Volkmann, K.R., Kaga, M. Sano, H. (2003). Sublethal, 2-week exposures of dental material components alter TNF-α secretion of THP-1 monocytes. *Dental Materials* 19(2): 101-105.
- Nyberg, F., Gustavsson, P., Jarup L. (2000). Urban air pollution and lung cancer in Stockholm. *Epidemiology* 11: 487-495.
- Obot, C.J., Morandi, M.T., Hamilton, R.F., Holian, A. (2004). A comparison of murine and human alveolar macrophage responses to urban particulate matter. *Inhalation Toxicology* 16(2): 69-76.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity *Eur. J. Biochem.* 267: 5421-5426.
- Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T. Shinagawa H. (1985). Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutation Res.* 147: 219-229.
- Ohtoshi, T., Takizawa, H., Okazaki, H., Kawasaki, S., Takeuchi, N., Ohta, Ito, K. (1998). Diesel exhaust particles stimulate human airway epithelial cells to produce cytokines relevant to airway inflammation *in vitro*. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 101(6): 778-785.

Okamura, K., Kizu, R., Toriba, A., Murahashi, T., Mizokami, A., Burnstein, K., Klinge, C., Hayakawa, C. (2004). Anti-androgenic activity of extracts of diesel exhaust particles from diesel-engine truck under different engine loads and speeds. *Toxicology* 195: 243-254.

Okeson, C.D., Riley, M.R., Fernandez, A., Wendt, J.O. (2003). Impact of the composition of combustion generated fine particles on epithelial cell toxicity: influences of metals on metabolism. *Chemosphere* 51(10): 1121-1128.

Okeson, C.D., Riley, M.R., Riley-Saxton, E. (2004). *In vitro* alveolar cytotoxicity of soluble components of airborne particulate matter: effects of serum on toxicity of transition metals. *Toxicol In vitro* 18(5): 673-680.

Okuda, B., Iwamoto, Y., Tachibana, H., Sugita, M. (1997). Parkinsonism after acute cadmium poisoning. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 99 : 263-265.

Oliva, A., Giami, A., Multigner, L. (2002). Environmental agents and erectile dysfunction: a study in a consulting population. *J Androl.* 2002 Jul-Aug;23(4):546-550.

Pankow, J.F. (1994.) An absorption model of the gas/particle partitioning of organic compounds in the atmosphere. *Atmospheric Environment* 28(9): 3083-3091.

Parchment, R. (1998). Alternative testing systems for evaluating noncarcinogenic, hematologic toxicity. *Env. Health Perspect* 106(2): 541-557.

Patandin, S., Lanting, C., Mulder, P.G., Boersma, E.R., Sauer, P.J., Weisglas-Kuperus, N. (1999). Effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on cognitive abilities in Dutch children at 42 months of age. *J Pediatr.* 1999 Jan;134(1):33-41. Comment in: *J Pediatr.* 1999 Jan;134(1):7-9.

Pauwels, A., Schepens, P.J., D'Hooghe, T., Delbeke, L., Dhont, M., Brouwer, A., Weyler, J. (2001). The risk of endometriosis and exposure to dioxins and polychlorinated biphenyls: a case-control study of infertile women. *Hum Reprod.* 16(10): 2050-2055

Pei, X-H., Nakanishi, Y., Inoue, H., Takayama, K., Bai, F., Hara, N. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons induce IL-8 expression through nuclear factor kappaB activation in A549 cell line. *Cytokine* 19(5): 236-241.

Pelletier, M., Lavastre, V., Girard, D. (2002). Activation of human epithelial lung a549 cells by the pollutant sodium sulfite: enhancement of neutrophil adhesion. *Toxicological Sciences* 69(1): 210-216.

Penman, B.W., Chen, L., Gelboin, H.V., Gonzalez, F.J., Crespi, C.L. (1994). Development of a human lymphoblastoid cell line constitutively expressing human CYP1A1 cDNA: substrate specificity with model substrates and promutagens. *Carcinogenesis* 15(9): 1931-1937.

Perera, F.P., Whyatt, R.M., Jedrychowski, W., Rauh, V., Manchester, D., Santella, R.M., Ottman, R. (1998). Recent developments in molecular epidemiology: A study of the effects of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons on birth outcomes in Poland. *Am. J. Epidemiol.* 147(3): 309-314.

Peters, A., Dockery, D.W., Muller, J.E., Mittleman, M.A. (2001). Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation.* 103: 2810-2815.

Pesatori, A. C., Consonni, D., Bachetti, S., Zocchetti, C., Bonzini, M., Baccarelli, A., Bertazzi, P. A. (2003). Short- and long-term morbidity and mortality in the population exposed to dioxin after the "Seveso accident". *Ind. Health,* 41: 127-138.

Pesatori, A.C., Zocchetti, C., Guercilena, S., Consonni, D., Turrini, D., Bertazzi, P.A. (1998). Dioxin exposure and non-malignant health effects: a mortality study. *Occup. Environ. Med.* 55(2): 126-131.

- Pessina, A., Albella, B., Bayo, M., Bueren, J., Brantom, P., Casati, S., Croera, C., Gagliardi, G., Foti, P., Parchment, R., Parent-Massin, D., Schoeters, G., Sibiril, Y., Van Den Heuvel R., Gribaldo, L. (2003). Application of the GM-CFU assay to predict acute drug-induced neutropenia: an international blind trial to validate a prediction model for the maximum tolerated dose (MTD) of myelosuppressive xenobiotics. *Toxicological Sciences*, 75(2): 355-367.
- Petralia, S.A., Vena, J.E., Freudenheim, J.L., Dosemeci, M., Michalek, .A, Goldberg, M.S., Brasure, J., Graham, S. (1999). Risk of premenopausal breast cancer in association with occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and benzene. *Scand J Work Environ Health*. 25(3): 215-221.
- Phillips, J.A 3rd, Hamid, R. (1999). Human mutations and their detection by gene and linkage analysis, allele sharing and association methods. *East Mediterr Health J*. 5(6): 1140-1146.
- Piersma, A.H. (2004). Validation of alternative methods for developmental toxicity testing. *Toxicology letters* 149: 147-153.
- Pitts, J.N. Jr, Van Cauwenberghe, K.A., Grosjean, D., Schmid, J.P., Fitz, D.R., Belser, W.L., Knudson, G.P., Hynds, P.M. (1978). Atmospheric reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons: facile formation of mutagenic nitro derivatives. *Science* 3;202(4367): 515-519.
- Pope, C.A. III, Thun M.J., Namboodiri, M.M., Dockery, D.W., Evans, J.S., Speizer, F.E., Heath C.W. Jr. (1995). Particulate air pollution as predictor of mortality in a prospective study of US adults. *Am J Resp. Crit. Care Med.*, 151: 669-674.
- Pope, C.A. III, Burnett, R.T., Thun, M.J. et al. (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*, 287(9): 1132-1141.
- Pozzi, R., De Berardis, B., Paoletti, L., Guastadisegni, C. (2003). Inflammatory mediators induced by coarse (PM_{2.5-10}) and fine (PM_{2.5}) urban air particles in RAW 264.7 cells. *Toxicology* 183(1-3): 243-254.
- Quay, J.L., Reed, W., Samet, J., Devlin, R.B. (1998). Air pollution particles induce IL-6 gene expression in human airway epithelial cells via NF-kappaB activation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 19(1) : 98-106.
- Quillardet, P., Hofnung M. (1985). The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutat. Res* 147 : 65-78.
- Quillardet, P., M. Hofnung (1993). The SOS chromotest: a review. *Mutat. Res*. 297: 235-279.
- Rabl, A. (2003). Interpretation of air pollution mortality: number of deaths or years of life lost? *J. Air Waste Manag. Assoc.* 53(1): 41-50.
- Rahman, N.A., Huhtaniemi I.T. (2004). Testicular cell lines. *Molecular and cellular endocrinology* 228(1-2): 53-65.
- Ramage, L., Keith, G. (2004). Expression of C-reactive protein and heat-chock protein-70 in the lung epithelial cell line A549, in response to PM₁₀ exposure. *Inhalation Toxicology* 16(6-7): 447-452.
- Reifferscheid, G., Heil, J., Oda, Y., Zahn, R. (1991). A microplate version of the SOS/umu-test for rapid detection of genotoxic potentials of environmental samples. *Mutat. Res*. 253(3): 215-222.
- Refsnes, M., Schwarze, P.E., Holme, J.A., Låg, M. (2003). Fluoride-induced apoptosis in human epithelial lung cells (A549 cells): role of different G protein-linked signal systems. *Human & Experimental Toxicology* 22(3): 111-123.
- Renan, M.J. (1993). How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol. Carcinog.*, 7(3): 139-46.

- Renwick, L.C., Donaldson, K., Clouter, A. (2001). Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 15, 172(2): 119-127.
- Reyes, D.R., Rosario, O., Rodriguez, J.F., Jimenez, B.D. (2000). Toxic evaluation of organic extracts from airborne particulate matter in Puerto Rico. *Environ. Health Perspect.* 108(7): 635-640.
- Ribas-Fito, N., Sala, M., Cardo, E., Mazon, C., De Muga, M. E., Verdu, A., Marco, E., Grimalt, J. O., Sunyer, J. (2002). Association of hexachlorobenzene and other organochlorine compounds with anthropometric measures at birth. *Pediatr. Res.* 52: 163-167.
- Ribas-Fito, N., Cardo, E., Sala, M., Eulalia, d. M., Mazon, C., Verdu, A., Kogevinas, M., Grimalt, J.O., Sunyer, J. (2003). Breastfeeding, exposure to organochlorine compounds, and neurodevelopment in infants. *Pediatrics* 111: 580-585.
- Ridder, G.M., Stuard, S.B., Kerckaert, G.A., Cody, D.B., LeBoeuf, R.A.; Isfort, R.J. (1997). Computerized image analysis of morphologically transformed and nontransformed Syrian hamster embryo (SHE) cell colonies: application to objective SHE cell transformation assay scoring. *Carcinogenesis* 18(10): 1965-1972.
- Rier, S.E., Martin, D.C., Bowman, R.E. et al.(1993). Endometriosis in Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fundam. Appl. Toxicol.* 21: 433.
- Rier, S.E., Martin, D.C., Bowman, R.E. Becker, J.L. (1995). Immuno-responsiveness in endometriosis: implications of estrogenic toxicants. *Environ-Health-Perspect.* 103(7): 151-156.
- Rivedal E., Haddeland U. (1996). Role of serum in the morphological transformation of Syrian Hamster embryo cells. Characterisation and partial purification of protein factors in fetal bovine serum. *Toxicology in vitro*, 10: 217-227.
- Ritter, D., Knebel, J., Aufderheide, M. (2004). Comparative assessment of toxicities of mainstream smoke from commercial cigarettes. *Inhalation Toxicology* 16(10): 691-700.
- Rodgers, K. (1998). Multiple chemical sensitivities. In: Wexler, P., Editor. *Encyclopedia of toxicology*. Volume 2. Academic Press Ltd. 351-354.
- Rose, M.C., Piazza, F.M., Chen, Y.A., Alimam, M.Z., Bautista, M.V., Letwin, N., Rajput, B. (2000). Model systems for investigating mucin gene expression in airway diseases. *Journal of Aerosol Medicine* 13(3): 245-261.
- Rosenkranz, H.S., Pollack, N., Cunningham, A.R. (2000). Exploring the relationship between the inhibition of gap junctional intercellular communication and other biological phenomena. *Carcinogenesis* 21(5): 1007-1011.
- Routledge, E.J., Sumpter, J.P. (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 241-248.
- Rudel, R.A., Camann, D.E., Spengler, J.D., Korn L.R., Brody, J.G. (2003). Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. *Envir. Sci. Technol.* 20: 4543-4553.
- Rumchev, K.B., Spickett, J.T., Bulsara, M.K., Phillips, M.R., Stick, S.M. (2002). Domestic exposure to formaldehyde significantly increases the risk of asthma in young children. *Eur. Respir. J.* 20(2): 403-408.
- Rundle, A., Tang, D., Hibshoos, H., Estabrook, A., Schnabel, F., Cao, W., Grumet, S., Perera, F.P. (2000). The relationship between genetic damage from polycyclic aromatic hydrocarbons in breast tissue and breast cancer. *Carcinogenesis* 21(7): 1281-1289.

- Ryan, J.J., Amirova, Z., Carrier, G. (2002). Sex ratios of children of Russian pesticide producers exposed to dioxin. *Environ. Health Perspect.* 110: A699-A701.
- Salnikow, K., Su, W., Blagosklonny, M.V., Costa, M. (2000). Carcinogenic metals induce hypoxia-inducible factor-stimulated transcription by reactive oxygen species-independent mechanism. *Cancer Research* 60(13): 3375-3378.
- Salvi, S., Holgate, S.T. (1999). Mechanisms of particulate matter toxicity. *Clin Exp Allergy*, 29: 1187-1194.
- Salvi, S., Holgate, T. (1999). Mechanisms of particulate matter toxicity. *Clinical and Experimental Allergy* 29: 1187-1194.
- Samet, J.M., Graves, L.M., Quay J., Daily, L.A., Devlin, R.B., Ghio, A.J., Wu, W., Bromberg, P.A., Reed, W. (1998). Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cells exposed to metals. *The American Journal of Physiology* 275(3): L551-L558.
- Samet, J.M., Zeger, S.L., Dominici, F. et al. (2000). The National Morbidity, Mortality, and Air Pollution Study. Part II: Morbidity, Mortality and Air Pollution in the United States. Health Effects Institute Research Report 94, Part II. Boston, US,
- Sarnat, J.A., Schwartz, J., Catalano, P.J., Suh, H.H. (2001). Gaseous pollutants in particulate matter epidemiology: confounders or surrogates? *Environ Health Perspect.* 109(10): 1053-1061.
- Satarug, S., Moore, M.R. (2004). Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke; *Environ. Health Perspect.* 112(10): 1099-1103.
- Sato, K., Iwamasa, T., Tsuru, T., Takeuchi, T. (1978). An ultrastructural study of chronic cadmium chloride induced neuropathy. *Acta Neuropathol. (Berl)* 41: 185-190.
- Savla, U., Spora, P.H., Waters, C.M. (1997); Cyclic stretch of airway epithelium inhibits prostanoid synthesis. *Am. J. Physiol.* 273(5): L1013-L1019.
- Savla, U., Waters, C.M. (1998). Barrier function of airway epithelium: effects of radiation and protection by keratinocyte growth factor. *Radiation Research* 150(2): 195-203.
- Scaccabarozzi, A., Arosio, P., Weiss, G., Valenti, L., Dongiovanni, P., Francanzani, A.L., Mattioli, M., Levi, S., Fiorelli, G., Fargion, S. (2000). Relationship between TNF-alpha and iron metabolism in differentiating human monocytic THP-1 cells. *British Journal of Haematology* 110(4): 978-984.
- Schauer, C., Niessner, R., Poschl, U.(2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air particulate matter: decadal and seasonal trends, chemical degradation, and sampling artifacts. *Environ Sci Technol* 1;37(13):2861-2868.
- Schechtman, L.M. (1985a). Balb/c 3T cell transformation: protocols, problems and improvements. *IARC Sci Publ.* 67: 165-84;
- Schechtman, L.M. (1985b). Metabolic activation of procarcinogens by subcellular enzyme fractions in the C3H 10T1/2 and Balb/c 3T3 cell transformation systems. *IARC Sci Publ.* 67:137-162.
- Schirmer, K, Chan, A.G., Greenberg, B.M., Dixon, D.G., Bols, N.C. (1998). Ability of 16 priority PAHs to be photocytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. *Toxicology* 15,127(1-3): 143-155
- Schmutzler, C., Hamann, I., Hofmann, P.J., Kovacs, G., Stemmler, L., Mentrup, B., Schomburg, L., Ambrugger, P., Grütters, A., Seidlova-Wuttke, D., Jarry, H., Wuttke, W., Köhrle J. (2004). Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology* 205: 95-102.
- Scholz, G., et al. (1999). Prevalidation of the embryonic stem cell test EST - a new *in vitro* embryotoxicity test. *Toxicology in vitro* 13: 675-681.

- Seagrave, J.C., Nikula, K.J. (2000). Multiple modes of responses to air pollution particulate materials in A549 alveolar type II cells. *Inhalation Toxicology* 12(4): 247-260.
- Semper, A.E., Hartley, J.A. (1996). Dendritic cells in the lung: what is their relevance to asthma? *Clinical and Experimental Allergy* 26: 485-490.
- Seth, R., Yang, S., Choi, S., Sabeen, M., Roberts, E.A. (2004). *In vitro* assessment of copper-induced toxicity in the human hepatoma line, Hep G2, *Toxicol In vitro* 18(4): 501-509.
- Sexton, K.G., Jeffrie, H.E., Jang, M., Kamens, R.M., Doyle, M., Voicu, I., Jaspers, I. (2004). Photochemical products in urban mixtures enhance inflammatory responses in lung cells. *Inhalation Toxicology* 16(1): 107-114.
- Shetty, S., Pendurthi, U.R., Halady, P.K., Azghani, A.O., Idell, S. (2002). Urokinase induces its own expression in Beas2B lung epithelial cells. *American Journal of Physiology* 283(2): L319-L328.
- Shetty, S., Bdeir, K., Cines, D.B., Idell, S. (2003). Induction of plasminogen activator inhibitor-1 by urokinase in lung epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* 278(20): 18124-18131.
- Shima M., Nitta Y., Adachi M. (2003). Traffic-related air pollution and respiratory symptoms in children living along trunk roads in Chiba Prefecture, Japan. *J Epidemiol.* 13(2):108-119.
- Siddiqui, M. K., Srivastava, S., Srivastava, S. P., Mehrotra, P. K., Mathur, N., Tandon, I. (2003). Persistent chlorinated pesticides and intra-uterine foetal growth retardation: a possible association. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 76: 75-80.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175(1): 184-191.
- Sivak A., Tu, A.S. (1985). Use of rodent hepatocytes for metabolic activation in transformation assays. *IARC Sci Publ.* 67: 121-135.
- Skakkebaek, N. E. (2002). Endocrine disrupters and testicular dysgenesis syndrome. *Horm. Res.* 57(2): 43.
- Smith, K.R., Aust, A.E. (1998). Mobilization of iron from urban particulates leads to generation of reactive oxygen species *in vitro* and induction of ferritin synthesis in human lung epithelial cells. *Chemical Research In Toxicology* 10(7): 828-834.
- Smith, K.R., Veranth, J.M., Hu, A.A., Lightly, J.S., Aust, A.E. (2000). Interleukin-8 levels in human lung epithelial cells are increased in response to coal fly ash and vary with the bioavailability of iron, as a function of particle size and source of coal. *Chemical Research In Toxicology* 13(2): 118-125.
- Soll-Johanning, H., Bach, E., Olsen, J.H., Tuchsén, F. (1998). Cancer incidence in urban bus drivers and tramway employees: a retrospective cohort study. *Occup Environ Med.* 55(9): 594-598.
- Song, M., Phelps, D.S. (2000). Comparison of SP-A and LPS effects on the THP-1 monocytic cell line. *American Journal of Physiology* 279(1): L110-L117.
- Sonneveld, E., Jansen, H.J., Riteco, J.A.C., Brouwer, A., van der Burg, B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays members of a panel of human cell line-based highly selective steroid responsive bioassays. *Toxicology Sciences* 83(1): 136-148
- Soong, W.T., Chao, K.Y., Jang, C.S., Wang, J.D. (1999). Long-term effect of increased lead absorption on intelligence of children. *Arch Environ Health* 54: 297-301.
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N., Serrano, F.O. (1995). The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect.* 103(7): 113-122.

- Srianujata, S. (1998). Lead--the toxic metal to stay with human. *J Toxicol Sci.* 23(2): 237-240.
- Staessen, J.A. Buchet, J.P., Ginucchio, G., Lauwerys, R.R., Lijnen, P., Roels, H., Fagard, R. (1996). Public Health Implications of Environmental Exposure to Cadmium and Lead: An overview of Epidemiological studies in Belgium. *J. Cardiovascular Risk* 3(1): 26-41.
- Staessen, J. A., Nawrot, T., Hond, E. D., Thijs, L., Fagard, R., Hoppenbrouwers, K., Koppen, G., Nelen, V., Schoeters, G., Vanderschueren, D., Van Hecke, E., Verschaeve, L., Vlietinck, R., Roels, H.A. (2001). Renal function, cytogenetic measurements, and sexual development in adolescents in relation to environmental pollutants: a feasibility study of biomarkers. *Lancet*, 357: 1660-1669.
- Staleva, L., Waltscheva, L., Golovinsky, E. Venkov, P. (1996). Enhanced cell permeability increased the sensitivity of a yeast test for mutagens, *Mutat. Res.* 370: 81-89.
- Stone, V., Shaw, J., Brown, D.M., MacNee, W., Faux, S.P., Donaldson, K. (1998). The role of oxidative stress in the prolonged inhibitory effect of ultrafine carbon black on epithelial cell function. *Toxicology in vitro* 12(6): 649-659.
- Stringer, B., Imrich, A., Kobzik, L. (1996). Lung epithelial cell (A549) interaction with unopsonized environmental particulates: quantitation of particle-specific binding and IL-8 production. *Experimental Lung Research* 22(5): 495-508.
- Stringer, B., Kobzik, L. (1998). Environmental particulate-mediated cytokine production in lung epithelial cells (A549): role of preexisting inflammation and oxidant stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 55(1): 31-44.
- Sonnenschein, C., Soto, A.M., Fernandez, M.F., Olea, N., Olea-Serrano, M.F., and Ruiz-Lopez, M.D. 1995. Development of marker of estrogenic exposure in human serum. *Clinical Chemistry* 41: 1888-1895.
- Spielmann, H. (1998). Reproduction and development. *Environmental Health Perspectives* 106 (2): 571-576.
- Steenland, K., Piacitelli, L., Deddens, J., Fingerhut, M., Chang L.I. (1999). Cancer, heart disease, and diabetes in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Natl Cancer Inst* 91(9):779-86.
- Steube, K.G., Meyer, C., Drexler, H.G. (1999). Constitutive protein expression of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) by myelomonocytic cell lines and regulation of the secretion by anti- and proinflammatory stimuli. *Leukemia Research* 23(9): 843-849.
- Steube, K.G., Meyer, C., Drexler, H.G. (2000). Multiple regulation of constitutive and induced interleukin 8 secretion in human myelomonocytic cell lines. *Cytokine* 12(8): 1236-1239.
- Steube, K.G., Meyer, C., Drexler, H.G. (2000). Induction and secretion of the chemokines interleukin-8 and monocyte chemotactic protein-1 in human immature leukemia cell lines. *Molecular Cell Biology Research Communications* 3(1): 60-65.
- St Louis, D.C., Woodcock, J.B., Fransozo, G., Blair, P.J. Carlson, L.M., Murillo, M., Wells, M.R., Williams, A.J., Smoot, D.S., Kaushal et al. (1999). Evidence for distinct intracellular signaling pathways in CD34+ progenitor to dendritic cell differentiation from a human cell line model. *Journal Of Immunology* 162(6): 3237-3248.
- Stokes, W.S. (2003). ICCVAM evaluation of *in vitro* test methods for detecting potential endocrine disruptors. NIH publication N° 03-4503.
- Swan, S.H., Elkin, E.P., Fenster, L. (1997). Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data [see comments]. *Environ Health Perspect* 105: 1228-1232.

- Takizawa, H., Ohtoshi, T., Kawasaki, S., Kohyama, T., Desaki, M., Kasama, T., Kobayashi, K., Nakahara, K., Yamamoto, K., Matsushima, K., Kudoh, S. (1999). Diesel exhaust particles induce NF-kappaB activation in human bronchial epithelial cells invitro: importance in cytokine transcription. *Journal of Immunology* 162 (8) : 4705-4711.
- Takizawa, H., Abe, S., Ohtoshi, T., Kawasaki, S., Takami, K., Desaki, M., Sugawara, I., Hashimoto, S., Azuma, A., Nakahara, K., Kudoh, S. (2000). Diesel exhaust particles up-regulate expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in human bronchial epithelial cells. *Clinical and Experimental Immunology* 120(2) : 356-362.
- Takizawa, H., Ohtoshi, T., Kawasaki, S., Abe, S., Sugawara, I., Nakahara, K., Matsushima, K., Kudoh, S. (2000). Diesel exhaust particles activate human bronchial epithelial cells to express inflammatory mediators in the airways: a review. *Respirology* 5(2):197-203.
- Takizawa, H., Abe, S., Okazaki, H., Kohyama, T., Sugawara, I., Saito, Y., Ohtoshi, T., Kawasaki, S., Desaki, M., Nakahar, K., Yamamoto, K., Matsushima, K., Tanaka, M., Sagai, M., Kudoh, S. (2003). Diesel exhaust particles upregulate ecotaxin gene expression in human bronchial epithelial cells via nuclear factor-kappa-B-dependent pathway. *American Journal of Physiology*. 284(6) : L1055-L1062.
- Timm, G.E. (2003). Revised draft detailed review paper on aromatase. EPA contract N° 68-W-01-023, Work assignment 2-7.
- Todokoro, M., Mochizuki, H., Tokuyama, K., Utsugi, M., Dobashi, K., Mori, M., Morikawa, A. (2004). Effect of ozone exposure on intracellular glutathione redox state in cultured human airway epithelial cells. *Inflammation*, 28(2): 105-114.
- Tong, S., Baghurst, P.A., Sawyer, M.G., Burns, J., McMichael, A.J. (1998a). Declining blood lead levels and changes in cognitive function during childhood: the Port Pirie cohort study. *JAMA* 280:1915-1919.
- Tong, S. (1998b). Lead exposure and cognitive development: persistence and a dynamic pattern. *J Peadiatr Child health* 34:114-118.
- Tong, Y., Ni, X., Zhang, Y., Chen, F., Zhang, G., Ye, S. (2002). Study of the toxicological mechanism of acidified aerosols. *Biol. Trace Elem. Res.* 85(2):149-56.
- Trosko, J.E. and Ruch R.J. (2002). Gap junctions as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. *Curr Drug Targets*, 3(6): 465-482.
- Tsuchiya & Umeda(1995). Improvement in the efficiency of the *in vitro* transformation assay method using Balb/3T3 A31-1-1 cells. *Carcinogenesis* 16(8): 1887-1894.
- Tsuda, A., Stringer, B.K., Mijailovich, S.M., Rogers, R.A., Hamada, K., Gray, M.L. (1999). Alveolar cell stretching in the presence of fibrous particles induces interleukin-8 responses. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 21(4): 455-462.
- Tu, A.S. (1984) Comparison of primary hepatocytes and S9 metabolic activation system for the C3H-10T 1/2 cell transformation assay. *Carcinogenesis*. 5 (11): 1431-1436.
- Turpin, B., Saxena, P., Andrews, E. (2000). Measuring and simulating particulate organics in the atmosphere: problems and prospects, *Atmospheric Environ.* 34: 2983-3013.
- Tuschl, H., Kovac, R., Weber, E. (2000). The expression of surface markers on dendritic cells as indicators for the sensitizing potential of chemicals. *Toxicology in vitro* 14(6): 541-549.
- Urbach, F (1997). Ultraviolet radiation and skin cancer of humans. *J Photochem Photobiol B* 40(1): 3-7.

- Van Biesen, G., Van Puymbroeck, S., Witters, H. (2000). Toxiciteitsidentificaties en -evaluaties van afvalwaters. Een meer directe benadering voor het opsporen van de oorzaken van toxiciteit van afvalwaters. *Chemie magazine* 4: 13-16.
- Van der Lelie, D., Regniers, L., Borremans, B., Provoost, A., Verschaeve, L. (1997). The VITOTOX[®] test, a SOS-bioluminescence *Salmonella typhimurium* test to measure genotoxicity kinetics. *Mutat. Res.* 389: 279-290.
- Vartiainen, T., Kartovaara, L., Tuomisto, J. (1999). Environmental chemicals and changes in sex ratio: analysis over 250 years in Finland. *Environ. Health Perspect.*, 107: 813-815.
- Van Waeleghem, K., De Clercq, N., Vermeulen, L., Schoonjans, F., Comhaire, F. (1996). Deterioration of sperm quality in young healthy Belgian men. *Hum. Reprod* 11: 325-329.
- Van Weeren, L., De Graaf, A., Jamieson, J.D., Batenburg, J.J., Valentijn, J.A. (2004). Rab3D and actin reveal distinct lamellar body subpopulations in alveolar epithelial type II cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 30(3): 288-295.
- Veranth, J.M., Reilly, C.A., Veranth, M.M., Moss, T.A., Langelier, C.R., Lanza, L.L., Yost, S. (2004). Inflammatory cytokines and cell death in BEAS-2B lung cells treated with soil dust, Lipopolysaccharide and Surface-Modified Particles. *Toxicological Sciences* 82: 88-96.
- Verheyen, G.R., Nuijten, J-M., Van Hummelen, P., Schoeters, G.R. (2004). Microarray analysis of the effect of diesel exhaust particles on *in vitro* cultured macrophages *Toxicology In vitro* 18(3): 377-391.
- Verstraelen, S., Van Den Heuvel, R., Nelissen, I., Witters, H., Verheyen, G., Schoeters, G. (2005) Flow cytometric characterisation of antigen presenting dendritic cells after *in vitro* exposure to diesel exhaust particles. *Toxicology in vitro* accepted
- Viaene, M.K. (1997) Literatuuroverzicht: neurotoxiciteit door beroepsmatig contact met organische solvents. Fonds voor Beroepsziekten.
- Viaene, M.K., Roels, H.A., Leenders, J., De Groof, M., Swerts, L.J.V.C., Lison, D., Masschelein, R. (1999). Cadmium: a possible etiological factor in peripheral neuropathy. *Neurotoxicology* 20: 7-16.
- Viaene, M.K., Masschelein, R., Leenders, J., De Groof, M., Swerts, L.J.V.C., Roels, H.A. (2000). Neurobehavioral effects of occupational exposure to cadmium: a cross-sectional epidemiological study. *Occup. Environ. Med.* 57: 19-27.
- Vliagoftis, H., Befus, A.D., Hollenberg, M.D., Moqbel, R. (2001). Airway epithelial cells release eosinophil survival-promoting factors (GM-CSF) after stimulation of proteinase-activated receptor 2. *The Journal Of Allergy And Clinical Immunology* 107(4): 679-685.
- von Bubnoff, D., de la Salle, H., Weßendorf, J., Koch, S., Hanau, D., Bieber, T. (2002) Antigen-presenting cells and tolerance induction. *Allergy* 57: 2-8.
- Von Mutius, E. (2000). The environmental predictors of allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105: 9-19
- Vos, J.G., Dybing, E., Greim, H.A., Ladefoged, O., Lambré, C., Tarazona, J.V., Brandt, I. Vethaak A.D. (2000). Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Critical reviews in toxicology* 30(1): 71-133.
- Vrijheid, M., Dolk, H., Armstrong, B., Boschi, G., Busby, A., Jorgensen, T., Pointer, P. (2002). Hazard potential ranking of hazardous waste landfill sites and risk of congenital anomalies. *Occup Environ Med.* 59(11): 768-776
- Wallaert, B., Fahy, O., Tscopoulos, A., Gosset, Ph., Tonnel, A.. (2000). Experimental systems for mechanistic studies of toxicant induced lung inflammation. *Toxicology Letters* 112: 157-163.

- Wang, J., Wu, W., Henkelmann, B., You, L., Kettrup, A., Schramm, K-W. (2003). Presence of estrogenic activity from emission of fossil fuel combustion as detected by a recombinant yeast bioassay. *Atmospheric Environment* 37: 3225-3235.
- Wang, J., Xie, P., Xu, Y., Kettrup, A., Schramm K-W. (2004). Differing estrogen activities in the organic phase of air particulate matter collected during sunny and foggy weather in a Chinese city detected by a recombinant yeast bioassay. *Atmospheric Environment* 38:6157-6166.
- Waring, J.F., Cavet, G., Jolly, R.A., McDowell, J., Dai, H., Ciurlionis, R., Zhang, C., Stoughton, R., Lum, P., Ferguson, A., Roberts, C.J., Ulrich, R.G. (2003). Development of a DNA microarray for toxicology based on hepatotoxin-regulated sequences. *EHP toxicogenomics : journal of the National Institute of Environmental Health Sciences* 111 (1T): 53-60.
- Waring, J.F., Ciurlionis, R., Jolly, R.A., Heindel, M. Ulrich, R.G. (2001). Microarray analysis of hepatotoxins *in vitro* reveals a correlation between gene expression profiles and mechanisms of toxicity. *Toxicology letters* 120(1-3): 359-368.
- Wataha, J., Ratanasathien, S., Hanks, C.T., Sun, Z. (1996). *In vitro* IL-1 β and TNF- α release from THP-1 monocytes in response to metal ions. *Dental materials* 12(5-6): 322-327.
- Wataha, J.C., Lockwood, P.E., Marek, M. Ghazi, M. (1999). Ability of Ni-containing biomedical alloys to activate monocytes and endothelial cells *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research* 45(3): 251-257.
- Wheelock, A.M., Zhang, L., Tran, M-U., Morin, D., Penn, S., Buckpitt, A.R., Plopper, C.G. (2004). Isolation of rodent airway epithelial cell proteins facilitates *in vivo* proteomics studies of lung toxicity. *American Journal of Physiology* 286(2): L399-L410.
- Wichmann, H.E., Peters, A. (2000). Epidemiological evidence of the effects of ultrafine particle exposure. *Phil Trans Royal Society London*, 358: 2751-2769.
- Wilson, M.R., Stone, V., Cullen, R.T., Searl, A., Maynard, R.L., Donaldson K. (2000). *In vitro* toxicology of respirable Montserrat volcanic ash. *Occup Environ Med.* 57(11): 727-733
- Wilson, M.R., Lightbody, J.H., Donaldson, K., Sales, J., Stone, V. (2002). Interactions between ultrafine particles and transition metals *in vivo* and *in vitro*. *Toxicology And Applied Pharmacology* 184,(3): 172-179.
- Wisnewski, A.V., Lemus, R., Karol, M.H., Redlich, C.A. (1999). Isocyanate-conjugated human lung epithelial cell proteins: A link between exposure and asthma? *The Journal Of Allergy And Clinical Immunology* 104(2): 341-347.
- Wisnewski, A.V., Srivastava, R., Herick, C., Xu, L., Lemus, R., Cain, H., Magoski, N.M., Karol, M.H., Bottomly, K., Redlich et al. (2000). Identification of human lung and skin proteins conjugated with hexamethylene diisocyanate *in vitro* and *in vivo*. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine* 162(6): 2330-2336.
- Witschi, C., Mrsny, R.J. (1999). *In vitro* evaluation of microparticles and polymer gels for use as nasal platforms for protein delivery. *Pharmaceutical Research* 16(3): 382-390.
- Witters, H., Berckmans, P., Vangenechten, C., Comhaire, F., D'Hooghe W., Hens, L., Verspecht, A., De Wit, J., Hoebeeck, A., Lafère, J. (2003). Opsporen van de verspreiding en effecten van stoffen met hormoonversturende werking in Vlaamse waters. Eindrapport 2003.
- Wottrich, R., Diabaté, S., Krug, H.F. (2004). Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture. *International Journal Of Hygiene And Environmental Health* 207(4): 353-361.

- Wottrich, R., Diabaté, S., Krug, H.F. (2004). Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 207(4):353-361.
- Wu, W., Graves, L.M., Jaspers, I., Devlin, R.B., Reed, W., Samet, J.M. (1999); Activation of the EGF receptor signaling pathway in human airway epithelial cells exposed to metals. *The American Journal of Physiology* 277(5): L924-L931.
- Xiao, G.G., Wang, M., Li, N., Loo, H.A., Nel, A.E. (2003). Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line. *The Journal of Biological Chemistry* 278(50): 50781-50790.
- Yagil-Kelmer, E., Kazmier, P., Rahaman, M.N., Bal, B.S., Tessman, R.K., Estes, D.M. (2004). Comparison of the response of primary human blood monocytes and the U937 human monocytic cell line to two different sizes of alumina ceramic particles. *Journal of Orthopaedic Research* 22(4): 832-838.
- Yang, H.M., Barger, M.W., Castranova, V., Ma, J.K., Yang, J.J. (1999). Effects of diesel exhaust particles (DEP), carbon black, and silica on macrophage responses to lipopolysaccharide: evidence of DEP suppression of macrophage activity. *Journal of Toxicology* 58(5): 261-278.
- Yang C.Y., Tseng Y.T., Chang C.C. (2003). Effects of air pollution on birth weight among children born between 1995 and 1997 in Kaohsiung, Taiwan. *J Toxicol Environ Health A*. 66(9): 807-816.
- Yoshida, Y., Sakaguchi, H., Ito, Y., Okuda, M., Suzuki, H. (2002). Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals using expression of co-stimulatory molecules, CD54 and CD86, on the naïve THP-1 cell line. *Toxicology in vitro* 17: 221-228.
- Zacharewski, T. (1998). Identification and assessment of endocrine disruptors: limitations of *in vivo* and *in vitro* assays. *Environmental Health Perspectives* 106 (2): 577-582.
- Zambad S.P., Urganlawar S.P., Umathe S.N. (1999): A synergistic decline in humoral and cellular immunity of diabetic mice on exposure to polluted air. *Indian J Physiol Pharmacol* 43(4):474-8
- Zeyneloglu, H., Arici, A., Olive, D.L. (1997). Environmental toxins and endometriosis. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 24: 307-329.
- Zhang, H., Borman, H.D., Myhr, B.C. (2004). Enhancement of the morphological transformation of Syrian hamster embryo (SHE) cells by reducing incubation time of the target cells. *Mutation research* 14,548 (1-2): 1-7.

HOOFDSTUK 7

BIJLAGEN

1 BIJLAGE: SYSTEMISCHE EN CYTOTOXICITEIT

1.1 Fiches voor geselecteerde tests systemische en cytotoxiciteit (CS)

Evaluatiefiche

Naam test: Neutraal Rood Test

Code: CS-1

Eindpunt:			
	Systeemtoxisch en cytotoxiciteit (CS)	X	
	Immuno-respiratoir (IR)		
	Genotoxisch-kankerverwekkend vermogen (GK)		
	Reproductie en endocriene toxiciteit (ER)		

Principe van de test:

De basis van deze cytotoxiciteitstest is dat een chemische stof interfereert met de celgroei op een dosisafhankelijke manier, hetgeen resulteert in een vermindering van celgroei en dus ook van celaantal. Neutraal rood (NR) wordt gebruikt om het aantal levende cellen te bepalen. NR is een zwak kationische kleurstof, die in de cel diffundeert en in intacte lysosomen bindt aan negatief geladen bindingsplaatsen. Beschadiging van de lysosomen door de teststof resulteert in een verminderde NR opname en binding.

De test kan toegepast worden op verschillende cellijnen, de procedure is telkens dezelfde. Data kunnen verzameld worden dmv colorimetrie. Absorbantie wordt gemeten bij 530 nm.

Meest relevante referenties:

- Babich, H. & Borenfreund, E. (1990) Applications of the neutral red cytotoxicity assay to *in vitro* toxicology (Review). *Alternatives to Laboratory Animals*, 18, 129-144.

Naam test: Neutraal Rood Test

Code: CS-1

Selectie criterium		Waarde⁵	Omschrijving	Referentie
Kosten van uitvoering	KU	7	Testuitvoering +/-400€	Vito
Snelheid van uitvoering	SU	7	Test zelf duurt 4u, blootstelling aan stalen niet inbegrepen: 2-4 dagen	Ecvam
Respons spectrum	RS			Cfr infra
Standaardprocedure en ringstudies	SR	10	Gevalideerde test met EEC standaardprocedure. ISO norm	Ecvam ISO 10993 OECD 432
Beschikbaarheid testsysteem	BT	7	Onderhoud zoogdiercellen, die als stock in stikstof bewaard worden	
Relevantie	RE	7	Enkel bij zeer hoge concentraties, nvt voor omgevingsconcentraties	Ecvam
Toepassing voor lucht	TL	10	Breed toegepast	Zie in tabel respons spectrum
Internationale erkenning	IE	0		

⁵ OVI: onvoldoende informatie en NVT: niet van toepassing

* schatting op basis van Vito-ervaring

Naam test: *Neutraal Rood Test*

Code: CS-1

Tabel : Lijst van stoffen/stofgroepen /agentia die in lucht kunnen voorkomen en risico's voor blootstelling inhouden

Groep	Specificaties	Getest (x)	Signaal (+ of -)	Gevoeligheid (LOEC of...)	Referentie
Partikels	Niet-gespecificeerd qua fractie of samenstelling				
	PM 10	x			Fuji (2002)
	PM 2.5				
	PM 1				
	Ultra-fijn stof				
	Dieselpartikels				
	Vliegas				
	Synthetische part. (C-, C/Fe-,...)				
	Andere: ..roet				
Extracten van partikels	Niet-gespecificeerd				
	Extract in organisch oplosmiddel (hexaan, dichloormethaan,...)	x			Reyes (2000), Bunger (2000)
Anorgan. pollutanten	Metalen: katalysatoren (Pt, Pd,...)				
	Andere metalen: Pb, Cd, As, Cr, Sb, Mn, Cu, Zn, Hg, Va, Ni...	x			Krumshnabel (2004), Seth (2004)
	Fluoride				
	Asbest				
Organische pollutanten	PAK's	x			Schirmer (1998)
	PCB's				
	MAK's: Benzeen, toluen, ..	x			
	Andere: acrylonitrile, butadieen, , vinylchloride,.....				
Andere					
Totaal +/x getest in %					

*: testrespons is + of -, of ovi (onvoldoende informatie)

Evaluatiefiche

Naam test: Alamar Blue Test

Code: CS-2

Eindpunt:			
	Systeemtoxisch en cytotoxiciteit (CS)	X	
	Immuno-respiratoir (IR)		
	Genotoxisch-kankerverwekkend vermogen (GK)		
	Reproductie en endocriene toxiciteit (ER)		

Principe van de test:

De AlamarBlue™ assay is een test om de metabole activiteit te meten van humane en dierlijke cellijnen. De assay kan ook toegepast worden op fungi en bacteriën. De assay kan gebruikt worden om de relatieve cytotoxiciteit van verschillende chemische agentia te bepalen. Wanneer de cellen blootgesteld worden aan cytotoxische agentia, zal de metabole activiteit van deze cellen veranderen (deze kan zowel verminderen als gestimuleerd worden) en deze verandering kan gemeten worden met de AlamarBlue™ assay. De test kan toegepast worden op verschillende cellijnen. De procedure verloopt telkens op dezelfde manier, enkel de incubatietijd met AlamarBlue™ kan verschillen naargelang de cellijn.

De AlamarBlue™ assay bestaat uit een fluorometrische/colorimetrische indicator die gebaseerd is op de detectie van metabole activiteit. Het gaat om een redox-indicator die zowel van kleur verandert als fluorescentie vertoont in respons op chemische reductie van het celgroeimedium, wat wijst op celgroei. De indicator zelf is niet toxisch voor de cellen en niet carcinogeen. Data kunnen verzameld worden dmv fluorescentiemeting. Fluorescentie wordt gemeten bij 530 nm excitatie golflengte en 590 nm emissie golflengte.

Meest relevante referenties:

John O'Brien, Ian Wilson, Terry Orton and François Pognan *Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity* Eur. J. Biochem. 267, 5421-5426 (2000)

Naam test: Alamar Blue Test

Code: CS-2

Selectie criterium		Waarde⁶	Omschrijving	Referentie
Kosten van uitvoering	KU	10	Testuitvoering +/-200€	Vito
Snelheid van uitvoering	SU	7	Test zelf duurt 4u, blootstelling aan stalen niet inbegrepen: 2-4 dagen	Vito, Biosource
Respons spectrum	RS			
Standaardprocedure en ringstudies	SR	3	In enkele artikels	Hamid (2004)
Beschikbaarheid testsysteem	BT	7	Onderhoud zoogdiercellen, die als stock in stikstof bewaard worden	
Relevantie	RE	7	Enkel bij zeer hoge concentraties, nvt voor omgevingsconcentraties	
Toepassing voor lucht	TL	5		Zie in tabel respons spectrum
Internationale erkenning	IE	0		

⁶ OVI: onvoldoende informatie en NVT: niet van toepassing

* schatting op basis van Vito-ervaring

Naam test: *Alamar Test*

Code: CS-2

Tabel : Lijst van stoffen/stofgroepen /agentia die in lucht kunnen voorkomen en risico's voor blootstelling inhouden

Groep	Specificaties	Getest (x)	Signaal (+ of -)	Gevoeligheid (LOEC of...)	Referentie
Partikels	Niet-gespecificeerd qua fractie of samenstelling	x			Don Porto Carrero (2000); Chauhan (2004)
	PM 10				
	PM 2.5				
	PM 1				
	Ultra-fijn stof				
	Dieselpartikels	x			Don Porto Carrero (2000)
	Vliegas				
	Synthetische part. (C-, C/Fe-,...)				
	Andere: ..roet	x			Don Porto Carrero (2000)
Extracten van partikels	Niet-gespecificeerd				
	Extract in organisch oplosmiddel (hexaan, dichloormethaan,...)	x			Don porto carrero (2000)
Anorgan. pollutanten	Metalen: katalysatoren (Pt, Pd,...)				
	Andere metalen: Pb, Cd, As, Cr,				
	Fluoride				
	Asbest				
Organische pollutanten	PAK's	x			Schirmer (1998)
	PCB's				
	MAK's: Benzeen, toluen,				
	Andere: acrylonitrile, butadieen, dichloormethaan, .				
Andere					
Totaal +/x getest in %					

*: testrespons is + of -, of ovi (onvoldoende informatie)

Evaluatiefiche

Naam test: MTT Test

Code: CS-3

Eindpunt:			
	Systeemtoxisch en cytotoxiciteit (CS)	X	
	Immuno-respiratoir (IR)		
	Genotoxisch-kankerverwekkend vermogen (GK)		
	Reproductie en endocriene toxiciteit (ER)		

Principe van de test:

MTT assay tetrazolium zout, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), wordt opgenomen in cellen en gereduceerd door een mitochondriaal dehydrogenase enzyme. Hierbij wordt een paars formazan product gegenereerd waarvoor celmembranen niet doorlaatbaar zijn, met accumulatie in gezonde cellen tot gevolg. Solubilisatie van de cellen resulteert in de vrijstelling van het product, hetgeen detecteerbaar is adhv colorimetrie. De mogelijkheid van cellen om MTT te reduceren is een indicatie voor de mitochondriale integriteit en activiteit van overlevende cellen in een toxiciteitstest.

Naam test: *MTT test*

Code: CS-3

Selectie criterium		Waarde⁷	Omschrijving	Referentie
Kosten van uitvoering	KU	7	Testuitvoering +/-400€	Vito
Snelheid van uitvoering	SU	7	Test zelf duurt 4u, blootstelling aan stalen niet inbegrepen: 2-4 dagen	Ecvam
Respons spectrum	RS			Tabel hierna
Standaardprocedure en ringstudies	SR	10	Gevalideerde test Ecvam voor corrosiviteit (huid)	Ecvam
Beschikbaarheid testsysteem	BT	7	Onderhoud zoogdiercellen, die als stock in stikstof bewaard worden	
Relevantie	RE	7	Enkel bij zeer hoge concentraties, nvt voor omgevingsconcentraties	Ecvam
Toepassing voor lucht	TL	10	Toegepast in diverse labo's	Zie in tabel respons spectrum
Internationale erkenning	IE	0		

⁷ OVI: onvoldoende informatie en NVT: niet van toepassing

* schatting op basis van Vito-ervaring

Naam test: MTT test

Code: CS-3

Tabel : Lijst van stoffen/stofgroepen /agentia die in lucht kunnen voorkomen en risico's voor blootstelling inhouden

Groep	Specificaties	Getest (x)	Signaal (+ of -)	Gevoeligheid (LOEC of...)	Referentie
Partikels	Niet-gespecificeerd qua fractie of samenstelling				
	PM 10	x			Dick et al, 2001
	PM 2.5	x			Tong et al., 2002
	PM 1				
	Ultra-fijn stof	x			Renwick et al., 2001
	Dieselpartikels				
	Vliegas				
	Synthetische part. (C-, C/Fe-,...)				
	Andere: ..roet	x			Wilson et al., 2000
Extracten van partikels	Niet-gespecificeerd				
	Extract in organisch oplosmiddel (hexaan, dichloormethaan,...)	x			Hsiao et al 2000
Anorgan. pollutanten	Metalen: katalysatoren (Pt, Pd,...)				
	Andere metalen: Pb, Cd, As, Cr, Sb, Mn, Cu, Zn, Hg, Va, Ni...	x			Okeson et al., 2003 & 2004
	Fluoride				
	Asbest				
Organische pollutanten	PAK's				
	PCB's				
	MAK's: Benzeen, styreen,...				
	Andere: acrylonitrile, butadieeen, dichloormethaan,.....				
Andere					
Totaal +/x getest in %					

*: testrespons is + of -, of ovi (onvoldoende informatie), NVT (niet van toepassing)

Evaluatiefiche

Naam test: Productie ROS (reactieve zuurstofdeeltjes) in epitheelcellen

Code: CS-4

Eindpunt:			
	Systeemtoxisch en cytotoxiciteit (CS)	X	
	Immuno-respiratoir (IR)		
	Genotoxisch-kankerverwekkend vermogen (GK)		
	Reproductie en endocriene toxiciteit (ER)		

Principe van de test:

Metten van oxidatieve stres in epitheliale cellijnen (A549, BEAS-2B, Calu-3) via de bepaling van ROS gerelateerde enzymen zoals superoxide dismutase (SOD) en glutathion peroxidase, reductase en transferase activiteit.

Naam test: Productie ROS (reactieve zuurstofdeeltjes) in epitheelcellen

Code: CS-4

Selectie criterium		Waarde⁸	Omschrijving	Referentie
Kosten van uitvoering	KU	7		
Snelheid van uitvoering	SU	5	Op voorwaarde dat de cellijn in cultuur is	
Respons spectrum en gevoeligheid	RS	10	87.5% (8 stoffen)	Zie tabel hierna
Standaardprocedure en ringstudies	SR	3		
Beschikbaarheid testsysteem	BT	7	Onderhoud zoogdiercellen, die als stock in stikstof bewaard worden	
Relevantie	RE	7		
Toepassing voor lucht	TL	7		
Internationale erkenning	IE	0		

⁸ OVI: onvoldoende informatie en NVT: niet van toepassing

* schatting op basis van Vito-ervaring

Naam test: Productie ROS (reactieve zuurstofdeeltjes) in epitheelcellen.

Code: CS-4

Tabel info ivm responspectrum en gevoeligheid

Groep	Specificaties	Getest (x)	Signaal (+ of -)	Gevoeligheid (LOEC of...)	Referentie
Partikels	Niet-gespecificeerd qua fractie of samenstelling	x(ambient) x(stone)	+ -		Ball,2000 Hetland,2001
	PM 10				
	PM 2.5	x	+		Calcabrini,2004
	PM 1				
	Ultra-fijn stof				
	Dieselpartikels				
	Vliegas	x	+		Ball,2000
	Synthetische part. (C-, C/Fe-,...)				
	Andere: ..roet Welding fumes	x x	+ +		Stone,1998 McNeilly,2004
Extracten van partikels	Niet-gespecificeerd				
	Extract in organisch oplosmiddel (hexaan, dichloormethaan,...)				
Anorgan. pollutanten	Metalen: katalysatoren (Pt, Pd,..)				
	Andere metalen: Pb, Cd, As, Cr, Sb, Mn, Cu, Zn, Hg, Va, Ni...	x	+		Salnikovw,2000
	Fluoride				
	Asbest				
Organische pollutanten	PAK's				
	PCB's				
	MAK's: Benzeen, toluen, styreen,...				
	Andere: acrylonitrile, butadieen, dichloormethaan, dichloorethaan, formaldehyde, trichloorethyleen, tetrachloorethyleen, vinylchloride,.....				
Andere	ozon	x	+		Todokoro,2004
Totaal +/x getest in %	87.5%	8	7		

*: testrespons is + of -, of ovi (onvoldoende informatie)

2 BIJLAGE : IMMUNO-RESPIRATOIRE TOXICITEIT

2.1 Overzicht protocols voor standaardtests

2.1.1 Huidirritatie

THE ZEIN TEST

This method determines the amount of the corn protein, zein, dissolved by a surfactant as mg nitrogen in 100ml of surfactant solution, the value of which is referred to as the "zein number". The method may be applicable to detergent raw materials as a screening test for the evaluation of the relative mildness of surfactants.

Contact: Dr. Cliff Martin, Albright & Wilson Ltd, UK. Protocol n°: 26

HUMAN SKIN FIBROBLAST/COLLAGEN LATTICE CYTOTOXICITY TEST

Skin fibroblasts are incorporated into 3-D collagen lattices containing the test compounds. An inhibition of lattice contraction indicates a possible toxic effect which is verified by trypan blue exclusion for cell viability.

Contact: Dr. Graham Priestley, The Royal Infirmary, UK. Protocol n°: 27

ARACHIDONIC ACID RELEASE AS A MEASURE OF MEMBRANE TOXICITY

The rate of release of arachidonic acid from the promonocytic human cell line U937 is used to assess the membrane-toxic effects of test compounds.

Contact: Univ.-Prof. Dr. H-P Klöcking, Klinikum der Friedrich-Schiller-Universitaet, D. Protocol n°: 87

CUTANEOUS TOXICITY TESTING USING SKIN ORGAN CULTURE

The dermal toxicity of topically applied test compounds to rabbit, human or pig skin is assessed in a two-compartment model. The 7-day culture period permits some aspects of the recovery process to be studied. Studies on dermal absorption and metabolism may also be done in this system.

Contact: Dr.J.J.M. van de Sandt, TNO, Nutrition and Food Research Institute, NL. Protocol n°: 103

CORROSITEX™ CONTINUOUS TIME MONITOR ASSAY

The corrosivity potential of a chemical may be predicted by measurement of its penetration through a calibrated biobarrier into a chemical detection system.

Contact: Dr. Rodger D. Curren, Institute for *In vitro* Sciences, USA. Protocol n°: 116
ECVAM Validation Study Protocol. Approved by the US DoT.

SKIN² ZK 1350 CORROSIVITY TEST

The corrosivity potential of a chemical may be predicted by measurement of its cytotoxic effect, as reflected in the MTT assay, on the SKIN² human full-skin tissue model.

Contact: Dr. Manfred Liebsch, ZEBET BfR, D. Protocol n°: 117
ECVAM Validation Study Protocol. Approved by the US DoT.

EPISKIN™ SKIN CORROSIVITY TEST

The corrosivity potential of a chemical may be predicted by measurement of its cytotoxic effect, as reflected in the MTT assay, on the EPISKIN™ reconstituted human epidermis.

Contact: Dr. David J. Esdaile, Aventis Crop Science, F. Protocol n°: 118
Regulatory Acceptance: included into Annex V of Council Directive 67/548/EEC part B.40 on skin corrosion (OJ 136, April 2000); and Draft OECD Test Guideline 431 approved by the OECD National Coordinators in May 2002.

EPIDERM™ SKIN CORROSIVITY TEST

The corrosivity potential of a chemical may be predicted by measurement of its cytotoxic effect, as reflected in the MTT assay, on the Epiderm™ human epidermal model.

Contact: Dr. Manfred Liebsch, ZEBET BfR, D. Protocol n°: 119
Regulatory Acceptance: included into Annex V of Council Directive 67/548/EEC part B.40 on skin corrosion (OJ 136, April 2000); and Draft OECD Test Guideline 431 approved by the OECD National Coordinators in May 2002.

RAT SKIN TRANSCUTANEOUS ELECTRICAL RESISTANCE (TER) TEST

The corrosivity potential of a chemical may be predicted from its effects on the transcutaneous

electrical resistance of rat skin and from its effects on the penetration of sulforhodamine B dye through the skin.

Contact: Dr. Lesley Earl, Unilever Research, UK. Protocol n°: 115
Regulatory Acceptance: included into Annex V of Council Directive 67/548/EEC part B.40 on skin corrosion (OJ 136, April 2000); and OECD Draft Test Guideline 430 approved by the OECD National Coordinators in May 2002.

2.1.2 Oogirritatie

BOVINE ISOLATED CORNEA TEST

This test is designed to detect damage to the eye after application to the conjunctiva.

Contact: Dr. B. Northover, De Montford University, UK. Protocol n°: 1

RABBIT ISOLATED TERMINAL ILEUM

This test is designed to predict the *in vivo* potential of a test compound to damage the eye after application to the conjunctiva.

Contact: Dr. B. Northover, De Montford University, UK. Protocol n°: 2

TETRAHYMENA THERMOPHILA OCULAR IRRITANCY TEST

The cytotoxic effect of chemicals upon the protozoan, *Tetrahymena thermophila*, in culture is assessed by studying their effect upon the normal motility of the organism. It is suggested that this test may form part of a small battery of *in vitro* tests in the evaluation of ocular irritancy potential.

Contact: Dr. Jerald Silverman, D.V.M., Hahnemann University, USA. Protocol n°: 22

AGAROSE OVERLAY ASSAY

This procedure describes the use of L929 mouse fibroblast cells cultured *in vitro* in an agarose overlay assay to assess the toxicity of test substances. The assay may be useful in assessing the irritation potential of test substances (e.g. surfactant-based products) as an alternative to the Draize rabbit eye test.

Contact: Ms. Manoj Dixit and Ms. Penny Jones, Unilever Research, UK. Protocol n°: 31

RED BLOOD CELL TEST SYSTEM

An *in vitro* red blood cell assay is presented which permits the estimation of the irritation potential of tensides and tenside containing materials such as shampoos, shower gels, cleaning products, etc.

Contact: Dr. Wolfgang Pape, Beiersdorf AG, D. Protocol n°: 37

LS-L929 CYTOTOXICITY TEST

This simple cell culture-based cytotoxicity test (in which cell viability is determined by uptake of the dyes ethidium bromide and fluorescein acetate) has been developed as a general test for acute toxicity.

Contact: Dr. R.B. Kemp, University College of Wales, UK. Protocol n°: 38

SIRC CYTOTOXICITY TEST

In this test, rabbit-derived corneal cells are cultured in the presence of test compounds, the toxicity of which are determined by their effect upon cell viability. A decrease in cell number, as measured by uptake of the dye Neutral Red, serves as an indicator of potential cytotoxicity. This test has been proposed as a potential replacement alternative for the Draize Eye Irritation test.

Contact: Dr. Monique Adolphe and Dr. Odile Blein, Ecole Pratique des Hautes Etudes, F. Protocol n°: 40
OPAL Validation Study Protocol.

BALB/C 3T3 CYTOTOXICITY TEST

The cytotoxic effect of chemicals upon Balb/c 3T3 cells in culture is measured by cell viability (Neutral Red Uptake) and total cell protein (Kenacid Blue R dye binding method).

Contact: Dr. med. H. Spielmann and Dr. M. Liebsch, ZEBET BfR, D. Protocol n°: 46
German BGA Validation Study Protocol

HET-CAM TEST

The potential irritancy of compounds may be detected by observing adverse changes which occur in the chorionallantoic membrane of the egg after exposure to test chemicals.

Contact: Dr. med. H. Spielmann and Dr. M. Liebsch, ZEBET BfR, D. Protocol n°: 47
German BGA Validation Study Protocol

THE FRAME NEUTRAL RED RELEASE ASSAY

This assay enables the short-term toxicity and irritation potential of test compounds to be determined by measurement of the release of vital dye from cultured cells.

Contact: Dr. Richard H. Clothier, Queen's Medical Centre, UK. Protocol n°: 54
Protocol evaluated in EC, CTFA, SDA and COLIPA Validation Studies.

THE POLLEN TUBE GROWTH TEST (PTG-TEST)

The cytotoxicity of chemicals is determined by measuring inhibition of pollen tube growth *in vitro*.

Contact: Prof. Dr. Udo Kristen, Dr. Rolf Kappler, and Jan P. van Aken, Universität Hamburg, D. Protocol n°: 55
CTFA and COLIPA Validation Study Protocol.

HEN'S EGG TEST -YOLK-SAC BLOOD VESSEL ASSAY

The toxicity of compounds may be assessed by treatment of the yolk sac blood system of the pre-sentient chick embryo. Toxicity is scored according to the severity of the acute and late reactions in the blood vessel system.

Contact: Dr. M. Rosenbruch, Bayer AG, D. Protocol n°: 56

EYE LENS ORGAN CULTURE

Long-term cultures of bovine whole lenses are used to assess the effect of drugs and chemicals on the refractive index (focal length) and transparency of the lens tissue. These endpoints are measured simultaneously by a computer-driven scanning laser system.

Contact: Prof. Jacob Sivak, University of Waterloo, Canada. Protocol n°: 60

THE NEUTRAL RED CYTOTOXICITY ASSAY

The cytotoxic effect of chemicals upon mammalian cells, such as BALB/c 3T3 and HepG2, in culture is measured by highest tolerated dose (HTD), cell viability (Neutral Red) and total cell protein (coomassie blue).

Contact: Dr. Ellen Borenfreund, The Rockefeller University, USA; Dr. Harvey Babich, Stern College, Yeshiva University, USA. Protocol n°: 64
EC, CTFA, SDA Validation Study Protocol.

THE FLUORESCEIN LEAKAGE TEST

Damage caused by the test compound to the tight junctions in MDCK monolayers is determined by the amount of fluorescein which leaks through the cell layer and is an indication of potential to cause eye irritancy.

Contact: Dr. Richard Clothier, Queen's Medical Centre, UK. Protocol n°: 71
EC/HO Validation Study Protocol.

HUMAN AND BOVINE LENS EPITHELIAL CULTURE

This procedure describes a method for routinely establishing finite but abundant primary explant cultures of human (and bovine) lens epithelial cells.

Contact: Ms. S.F. Webb, University of East Anglia, UK. Protocol n°: 57

CHICKEN ENUCLEATED EYE TEST (CEET)

The isolated eye of a chicken is exposed to the test compound and assessed for corneal swelling, corneal opacity and fluorescein retention in order to evaluate the eye irritation potential of the compound.

Contact: Dr. Menk Prinsen, TNO-CIVO Institutes, NL. Protocol n°: 80
EC/HO Validation Study Protocol.

FIXED DOSE PROCEDURE FOR THE FLUORESCEIN LEAKAGE TEST

Damage caused by a fixed dose of test compound to the tight junctions in MDCK monolayers is determined by the amount of fluorescein which leaks through the cell layer and is an indication of potential to cause eye irritancy, and hence the need to label the products with suitable warnings.

Contact: Dr. Richard Clothier, Queen's Medical Centre, UK. Protocol n°: 82

THE RABBIT ENUCLEATED EYE TEST

The isolated eye of a rabbit is exposed to the test compound and assessed for corneal swelling, corneal opacity and fluorescein retention in order to evaluate the eye irritation potential of the compound.

Contact: Dr. Lesley Earl, Unilever Research and Engineering, UK. Protocol n°: 85
EC/HO Validation Study Protocol.

TRANS-EPITHELIAL PERMEABILITY (TEP) ASSAY

The ocular irritation potential of a product can be evaluated by determining its effect on the permeability of a cell layer, as assessed by the leakage of fluorescein through the layer.

Contact: Dr. Katharine Martin, Dr. Stephen Koontz, Johnson & Johnson Consumer Products Worldwide R&D&E, USA. Protocol n°: 86
Protocol of the CTFA Alternative Evaluation Program.

EYTEX™ PROTOCOL

The reduction in light transmission resulting from precipitate caused by the interaction of the test compound with a protein matrix is predictive of the potential of the test compound to cause eye irritancy.

Contact: Dr. V.C. Gordon, InVitro International, USA. Protocol n°: 110
EC/HO and COLIPA Validation Study Protocol.

THE SILICON MICROPHYSIOMETER TOXICITY TEST - Microbiological Associates

The effects of a test compound on intracellular metabolism, as reflected by a decrease in the extracellular acidification rate, can be used as a measure of eye irritancy potential. The potential of the cells to recover from the exposure may also be determined.

Contact: Dr. John W. Harbell, Microbiological Associates Inc., USA. Protocol n°: 97
EC/HO and COLIPA Validation Study Protocol.

THE BOVINE CORNEAL OPACITY AND PERMEABILITY ASSAY (BCOP) - Method of Gautheron

The effects of a test compound on the opacity and permeability of a freshly collected bovine cornea can be used as a measure of eye irritancy potential.

Contact: Dr. P. Gautheron, Laboratoires MSD Chibret, F. Protocol n°: 98
EC/HO Validation Study Protocol

RED BLOOD CELL LYSIS AND PROTEIN DENATURATION

The membranolytic activity of a test substance and its ability to cause protein denaturation in mammalian erythrocytes is a measure of its cytotoxicity and also of its potential irritancy to the eye.

Contact: Dr. R.W. Lewis, ZENECA Central Toxicology Laboratory, UK. Protocol n°: 99
EC/HO and COLIPA Validation Study Protocol.

NEUTRAL RED BIOASSAY USING BALB/c 3T3 CELLS

The potential of the test substance to inhibit neutral red uptake in cultures of BALB/c 3T3 clone A31 cells may be used as a measure of its cytotoxicity and also of its potential irritancy to the eye.

Contact: Dr. John W. Harbell, Microbiological Associates Inc., USA Protocol n°: 100
EC/HO and COLIPA Validation Study Protocol.

THE SILICON MICROPHYSIOMETER TOXICITY TEST - Procter and Gamble

The effects of a test compound on intracellular metabolism, as reflected by a decrease in the extracellular acidification rate, can be used as a measure of eye irritancy potential. The potential of the cells to recover from the exposure may also be determined.

Contact: Dr. Rosemary Osborne, The Procter and Gamble Company, USA. Protocol n°: 102
EC/HO Validation Study Protocol.

CAM-TBS TEST

In this modification of the HET-CAM test, trypan blue staining provides an objective and quantitative assessment of the degree of damage to the chicken chorioallantoic membrane (CAM).

Contact: Dr. Hiroshi Itagaki, Dr. Shingobu Hagino, Dr. Shinobu Kato, Shiseido Research and Analytical Center, Japan. Protocol n°: 108
Japanese Validation Study Protocol.

HAEMOGLOBIN DENATURATION AS A MODEL FOR PREDICTING IRRITANCY

The degree to which a surfactant causes denaturation of haemoglobin can be used to predict its potential to cause ocular irritation.

Contact: Dr. Hiroshi Itagaki, Mr. Toshikatsu Hayashi or Dr. Shinobu Kato, Shiseido Safety and Analytical Research Center, Japan.
Protocol n°: 109
Japanese Validation Study Protocol.

THE HEN'S EGG TEST ON THE CHORIOALLANTOIC MEMBRANE (HET-CAM)

The acute irritation potential of a test substance to mucous membranes is reflected in its effects on the chorioallantoic membrane of a fertilized, incubated hen's egg. This method is a potential alternative to the Draize eye irritation test.

Contact: Dr. W. Steiling, Henkel KGaA, D. Protocol n°: 96
EC/HO and COLIPA Validation Study Protocol.

THE FLUORESCEIN LEAKAGE TEST - SOP of L'Oreal

Damage caused by the tested compound to the tight junctions in MDCK monolayers is determined by the amount of fluorescein which leaks through the cell layer and is an indication of potential to cause eye irritancy.

Contact: Dr. Muriel Buiatti, L'Oreal Advanced Research Laboratories, F. Protocol n°: 120
ECVAM and COLIPA Validation Study Protocol.

[THE BOVINE CORNEAL OPACITY AND PERMEABILITY \(BCOP\) ASSAY - SOP of Microbiological Associates LTD., UK](#)

The effects of a test compound on the opacity and permeability of a freshly collected bovine cornea can be used as a measure of eye irritancy potential.

Contact: Philip Williamson, Derby Technical Centre, Derby, UK Protocol n°: 124
Protocol of the ECVAM Prevalidation project.

2.1.3 Huidsensitatie

[Murine Local Lymph Node Assay \(LLNA\)](#)
LLNA Report (March 1999) - [PDF](#) (9.4 MB)

2.2 Vergelijkende tabel met testinformatie voor fiches immuno-respiratoire toxiciteit

<i>In vivo</i> target	<i>In vitro</i> testsysteem	Blootstelling	Eindpunt	Referentie
BRONCHI				
Bronchiale epitheelcellen	Calu-3 (cell line)	-	Prostanoid synthesis: prostaglandin (PG) E2, PGI2, thromboxane A2	Savla et al., Am J Physiol, 273, L1013-1019 (1997)
		-	Il-6 (mRNA and protein)	Bihl et al., Am. J. Respir; Cell Mol. Biol., 19 (4), 606-612 (1998)
		Ionizing radiation, keratinocyte growth factor (KGF)	Permeability monolayers	Savla et al., Radiation Research, 150 (2), 195-203 (1998)
		Starch, alginate, chitosan or Carbopol microparticles	Relative bioadhesion, enhancement of protein transport, induction of cytokine release (iL-1 beta, il-6, il-8, TNF-alfa, GM-CSF, TGF-beta)	Witschi et al., Pharmaceutical Research, 16 (3), 382-390 (1999)
		Sodium 4-phenylbutyrate (PBA)	wild-type CF transmembrane conductance regulator (wt CFTR))-mediated Cl(-) secretion	Loffing et al., Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 277, L700-L708 (1999)
		IL-1 beta	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) expression	Brouillard et al., Biol. Chem., 276 (12), 9486-9491 (2001)
		-	<i>In vitro</i> drug transport and metabolism studies	Forbes B, PSTT (3), 18-27 (2000)
		-	Calu-3 as a model for the airway epithelium in a number of drug transport and metabolism studies; TEER values for Calu-3 monolayers	Foster et al., International Journal of Pharmaceutics, 208, 1—1 (2000)
		Il-4, il-13	Mucin gene expression	Rose et al., Journal Of Aerosol Medicine: The Official Journal Of The International Society For Aerosols In Medicine, 13 (3), 245-261 (2000)
		Diethylenetriamine	Intracellular en apical cystic	Bebok et al., The Journal Of Biological Chemistry,

	NONOate (DETA NONOate), NO	fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) levels	277 (45), 43041-43049 (2002)
	Reactive oxygen species (ROS) hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	Transepithelial anion secretion	Cowley et al., The Journal Of Physiology, 543 (1), 201-209 (2002)
	Bisphenol A	Cl(-) secretion	Ito et al., The Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics, 302 (1), 80-87 (2002)
	-	Calu-3 as a model for the airway epithelium in a number of drug transport and metabolism studies	Florea et al., Journal of Controlled Release, 87, 131-138 (2003)
	Isoprostane 8-iso-prostaglandin E2 (8-iso-PGE2)	Transepithelial anion secretion	Cowley et al., Molecular Pharmacology, 64 (2), 298-307 (2003)
	Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂), keratinocyte growth factor (KGF)	Role of the actin cytoskeleton (amount of total actin), role of the actin-myosin contractile mechanism (amount of myosin heavy chain (MHC))	Boardman et al., Journal Of Cellular Physiology, 199 (1), 54-66 (2004)
	Ozone	Intracellular redox state: measuring reduced (GSH) of oxidized (GSSG) glutathione, cytokine production (il-6, il-8 (mRNA en protein))	Todokoro et al., Inflammation, 28 (2), 105-114 (2004)
Beas-2B (cell line)	Melittin, phospholipase A2 (PLA2) inhibitor mepacrine, ozon	Release of arachidonic acid (AA) and platelet activating factor (PAF)	Madden et al., Prostaglandins, 48 (3), 197-215 (1994)
	PM	Genotoxic activity: induction of 'sister chromatid exchanges'	Hornberg et al., Toxicology <i>in vitro</i> 11, 711-715 (1997)
	Mite cysteine and serine proteolytic allergens: Der p1, Der p9	Il-6, GM-CSF, il-8	King et al., Journal Of Immunology, 161 (7), 3645-3651 (1998)
	PM (urban)	Il-6, il-8	Kennedy et al., American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology, 19 (3), 366-378 (1998)
	Ozone	Inflammatory cytokines: il-6 and il-8	Mögel et al., Toxicology Letters 96,97, 25-32 (1998)

	Residual oil fly ash (ROFA)	Il-6 mRNA, NF-k β	Quay et al., American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology, 19 (1), 98-106 (1998)
	Ozone	mRNA of α 1 procollagens type I and III, as well as TGF β 1 in HFL-1, and the gene expression of TGF β 2, PDGF, iL-8 in HFL-1 (lung fibroblasts) and Beas-2B	Lang et al., Toxicology Letters 96-97, 13-24 (1998)
	Suspended particulate matter (DEP) (Provo, Utah)	Il-6, il-8, GM-CSF	Ohtoshi et al., The Journal Of Allergy and Clinical Immunology, 101 (6), 778-785 (1998)
	As, Cr, Cu, Fe, Ni, V, Z	Mitogen-activated protein kinases (MAPK), extracellular receptor kinase (ERK), c-Jun NH2-terminal kinase (JNK), p38, il-8	Samet et al., The American Journal Of Physiology, 275 (3), L551-L558 (1998)
	As, Cu, V, Zn	Mechanisms metal-induced activation of ERK (extracellular signal-regulated kinase)	Wu et al., The American Journal Of Physiology, 277 (5), L924-L931 (1999)
	Residual oil fly ash particles (ROFA)	IL-6, iL-8, TNF-alpha	Veronesi et al., Toxicology And Applied Pharmacology, 154 (1), 106-115 (1999)
	DEP	IL-8 gene expression	Takizawa et al., Journal Of Immunology, 162 (8) 4705-4711 (1999)
	DEP	Il-8, GM-CSF NF-kB and AP-1 activation	Takizawa et al., Respirology, 5 (2), 197-203 (2000)
	TNF-alpha	Clara cell secretory protein (CCSP) mRNA levels	Cowan et al., Annals Of The New York Academy Of Sciences, 923, 193-201 (2000)
	DEP	ICAM-1	Takizawa et al., Clinical And Experimental Immunology, 120 (2), 356-362 (2000)
	Il-9	Il-16, RANTES	Little et al., American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology, 25 (3), 347-352 (2001)
	Several components extracted from DEPs	Il-8 expression	Kawasaki et al., American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology, 24 (4), 419-426 (2001)

	(uPA) urokinase-type plasminogen activator	uPA expression	Shetty et al., American Journal Of Physiology. Lung Cellular And Molecular Physiology, 283 (2), L319-L328 (2002)
	Nikkel (Ni3S2, NiCl2)	Activation of activator protein-1 (AP-1) and nuclear factor KB (NF-kappaB)	Huang et al., Environmental Health Perspectives, 110 (5), 835-839 (2002)
	PM1.0-2.5, PM2.5-10	Il-8, lipid peroxidation products	Huang et al., Environmental Health Perspectives, 111 (4), 478-482 (2003)
	PM, synthetic particles (PC10 and PC2)	TRPV1 (VR1), ASIC1q, and ASIC3 subunits of proton-gated ion channels, intracellular calcium	Agopyan et al., Toxicology and Applied Pharmacology, 192 (1), 21-35 (2003)
	IFN-gamma	p11 (mRNA en protein)	Huang et al., The Journal Of Biological Chemistry, 278 (11), 9298-9308 (2003)
	tcuPA (two chain urokinase-type plasminogen activator)	Expression of PAI-1 (mRNA en protein level)	Shetty et al., The Journal Of Biological Chemistry, 278 (20), 18124-18131 (2003)
	Toluene diisocyanate (TDI)	Il-8	Lee et al., J Korean Med Sci 18, 809-812 (2003)
	Respiratory irritants: Cr(II), Mn, Ni	cytotoxicity (MTT assay), il-6, il-8	Pascal et al., Toxicology Letters 147, 143-151 (2004)
	PM _{2.5} (soil dust)	Il-6, il-8	Veranth et al., Toxicological Sciences, 82, 88-96 (2004)
	dsRNA	mRNA and cell-surface protein for B7 homologs	Kim et al., Journal of Allergy and Clinical Immunology, 113 (2), S247 (2004)
NHBE (normal human bronchial epithelial cells) (primary cells)	Residual oil fly ash particles (ROFA),	Il-8, Il-6, and TNF- α	Carter et al., Toxicology And Applied Pharmacology, 146 (2), 180-188 (1997)
	DEP	Il-8, GM-CSF soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1)	Bayram et al. American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology, 18 (3), 441-448 (1998)
	Il-4, il-13	Mucin gene expression	Rose et al., Journal Of Aerosol Medicine: The Official Journal Of The International Society For Aerosols In Medicine, 13 (3), 245-261 (2000)
	Cell-permeable antioxidants: pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)	TNF- α induced ICAM-1 surface and gene expression	Krunkosky et al., Free Radical Biology & Medicine, 35 (9), 1158-1167 (2003)

	and dimethylthiourea (DMTU)		
	DEP	eotaxin	Takizawa et al., American Journal Of Physiology. Lung Cellular And Molecular Physiology, 284 (6), L1055-L1062 (2003)
	PM, synthetic particles (PC10 and PC2)	TRPV1 (VR1), ASIC1q, and ASIC3 subunits of proton-gated ion channels, intracellular calcium	Agopyan et al., Toxicology and Applied Pharmacology, 192 (1), 21-35 (2003)
	NO ₂	Cellular pro-inflammatory responses: NO, il-8, TNF- α , IFN- γ en il-1 β	Ayyagari et al., Toxicology 197, 149-164 (2004)
	ML-1	GM-CSF expression	Kawaguchi et al., Journal of Allergy and Clinical Immunology, 113 (2) S195 (2004)
	DEP	IL-8 gene expression	Takizawa et al., Journal Of Immunology, 162 (8) 4705-4711 (1999)
SAEC (normal human small airway epithelial cells) (primary cells)	PAR-2-activating peptides	GM-CSF, eotaxin	Vliagoftis et al., Journal of Allergy and Clinical Immunology, 107 (4), 679-685 (2001)
	PM, synthetic particles (PC10 and PC2)	TRPV1 (VR1), ASIC1q, and ASIC3 subunits of proton-gated ion channels, intracellular calcium	Agopyan et al., Toxicology and Applied Pharmacology, 192 (1), 21-35 (2003)
16HBE14o- (cell line)	Ionizing radiation, keratinocyte growth factor (KGF)	Permeability monolayers	Savla et al., Radiation Research, 150 (2), 195-203 (1998)
	DEPs	GM-CSF	Boland et al., American Journal Of Physiology. Lung Cellular And Molecular Physiology ,278 (1), L25-L32 (2000)
	SRM 1650, representative cars (RC-DEP)	Phagocytosis, release of GM-CSF, LDH release	Boland et al. Toxicology <i>in vitro</i> , 15 (4-5), 379-385 (2001)
	DEP, DEP organic extracts (OE-DEP) , stripped DEP (sDEP), CB	GM-CSF release, NF-kappaB activation and MAPK phosphorylation, expression of the CYP1A1	Bonvallet et al., American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology, 25 (4), 515-521 (2001)
	DEPs	Release of cytokines, triggering MAP kinase pathways (ERK1/2, P38), activation nuclear factor NF-kappaB, ROS	Marano et al., Cell Biology And Toxicology, 18 (5), 315-320 (2002)
	Diethylenetriamine	Intracellular en apical cystic	Bebok et al., The Journal Of Biological Chemistry,

		NONOate (DETA NONOate), NO	fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) levels	277 (45), 43041-43049 (2002)
BRONCHIOLI				
Clara-cellen	Human/ Animal Clara cells (primary cells)	smoke	Clara cell protein (CC16)	Bernard et al., Occupational And Environmental Medicine, 54, 1, 63-65 (1997)
		Ozone	Clara cell protein (CC16)	Arsalane et al., Toxicology and Applied Pharmacology, 159 (3), 169-174 (1999)
		-	Expression of CYP (1A1, 1B1, 2B6, 2E1, 2J2, 3A5)	Hukkanen et al., Critical Reviews in Toxicology, 32 (2002)
		Silicon carbide whiskers (SiCW, an asbestos substitute)	Clara cell secretory protein (CCSP)	Morimoto et al., Toxicology Letters, 145, 273-279 (2003)
		Ozone	Clara cell protein (CC16)	Blomberg et al., The European Respiratory Journal, 22 (6), 883-888 (2003)
		-	CC10, Th2 cytokine and GATA-expression	Hung et al., Journal of Allergy and Clinical Immunology, 114 (3), 664-670 (2004)
		-	Clara cell secretory protein (CC16)	Gioldassi et al., Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 34, 823-826 (2004)
		-	Clara cell Secretory Protein, p180 lamellar body protein, Rab3D	Van Weeren et al., American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology, 30 (3), 288-295 (2004)
		-	Method for isolation of rodent airway epithelial cell proteins that facilitates <i>in vivo</i> proteomic studies	Wheelock et al., American Journal Of Physiology. Lung Cellular And Molecular Physiology, 286 (2), L399-L410 (2004)
		Recombinant CC10	Th2 cytokines and IFN- γ	Hung et al., Journal of Allergy and Clinical Immunology, 113 (2), S210 (2004)
	CRL-5807 (cell line)			
	CRL-5819 (cell line)			
	HTB-174 (cell line)			
ALVEOLI				
Alveolaire epitheelcellen type II	A549 (Cell line)	TiO ₂ , Fe ₂ O ₃ , CAPs, fibrogenic particle alpha-quartz	Interaction of alveolar epithelium with environmental particulates	Stringer et al., Experimental Lung Research, 22 (5), 495-508 (1996)

	PM	Cytotoxicity: 'plating efficiency'	Hornberg et al., <i>Toxicology in vitro</i> 11, 711-715 (1997)
	SRM 1648, SRM 1649(urban)	single-strand breaks (SSBs)	Smith et al., <i>Chemical Research In Toxicology</i> , 10 (7), 828-834 (1997)
	Ozone, air	Il-8 (mRNA, protein), NF-kappaB, NF-ii-6, AP-1	Jaspers et al., <i>The American Journal Of Physiology</i> , 272 (3), L504-L511 (1997)
	-	Il-6 (mRNA and protein)	Bihl et al., <i>Am. J. Respir; Cell Mol. Biol.</i> , 19 (4), 606-612 (1998)
	Ozone, air	Il-8, transcription factor activities	Jaspers et al., <i>Journal Of Cellular Physiology</i> , 177 (2), 313-323 (1998)
	Fine and ultrafine (uf) carbon black, quartz	MTT, ROS, glutathion	Stone et al., <i>Toxicology in vitro</i> , 12, 649-659 (1998)
	Air pollution particulates, residual oil fly ash (ROFA), alpha-quartz	Il-8	Stringer et al., <i>Journal Of Toxicology And Environmental Health. Part A</i> , 55 (1), 31-44 (1998)
	LPS, formaldehyde, glycans, methyl methacrylate (MMA), DNCB, nickel sulphate, SDS	Il-8	Hansen et al., <i>Journal Of Immunological Methods</i> , 226 (1-2), 49-58 (1999)
	Glass or crocidolite asbestos fibers	Il-8	Tsuda et al., <i>American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology</i> , 21 (4), 455-462 (1999)
	Xanthine, xanthine oxidase, S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP)	TGF-beta1	Bellocoq et al., <i>American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology</i> , 21 (1), 128-136 (1999)
	Vapor- and liquid-phase HDI	Conjugation polypeptides (47, 71, 91 kDa), PBMC proliferation	Wisnewski et al., <i>The Journal of Allergy and Clinical Immunology</i> , 104 (2), 341-347 (1999)
	Co(II), Ni(II)	ROS, Cap43	Salnikow et al., <i>Cancer Research</i> , 60 (13), 3375-3378 (2000)
	Carbon black, diesel soot, oil fly ash, OAA (Ottawa Ambient Air particulate), SiO2, Ni3S2	cytotoxicity, Il-8 release, alkaline phosphatase activity, cell proliferation	Seagrave and Nikula, <i>Inhalation Toxicology</i> , 12 (4), 247-260 (2000)

	II-4, il-13	Mucin gene expression	Rose et al., Journal Of Aerosol Medicine: The Official Journal Of The International Society For Aerosols In Medicine, 13 (3), 245-261 (2000)
	Pro-inflammatory cytokines (II-1 α , II-1 β , TNF- α , TNF- β)	ICAM-1 expression, production chemokines: il-8 and MCP-1	Krakauer et al., Immunopharmacology 46, 253-261 (2000)
	HDI (hexamethylene diisocyanate)	Conjugation proteins (keratin 18, actin, dihydrodiol dehydrogenase, albumin)	Wisnewski et al., American Journal of Respiratory and Rritical Care Medicine, 162 (6), 2330-2336 (2000)
	PM10, PM2.5	MTT	Dick et al., Atmospheric Environment 34, 2587-2592 (2000)
	SRM 1648, SRM 1649 (ambient), coal fly ash (CFA)	ROS, il-8	Ball et al., Inhalation Toxicology, 12 (4), 209-225 (2000)
	PAR-2-activating peptides	GM-CSF, eotaxin	Vliagoftis et al., Journal of Allergy and Clinical Immunology, 107 (4), 679-685 (2001)
	DEP, UP, CB	Genotoxiciteit:Comeet test	Don Porto Carero et al., Environ Mol Mutagen, 37 (2), 155-163, (2001)
	DEP, UP, CB Extract van DEP,UP,CB	Il-8, il-6	Don Porto Carero et al., PhD thesis(2002)
	Stone quarry particles	Il-6, il-8, TNF-alpha, ROS	Hetland et al., Toxicology, 165 (2-3), 133-144 (2001)
	PM ₁₀ , titanium dioxide en ultrafijn TiO ₂ exposed human monocyte-derived macrophages supernatants	NF- κ B, AP-1, TNF- α , il-8	Jiménez et al., American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology, 282 (2), L237-L248 (2002)
	Benzo(a)pyrene, 1-nitropyrene	Il-8 expression, NF-kappaB activity	Pei et al., Cytokine, 19 (5), 236-241 (2002)
	Na ₂ SO ₃	Tyrosine phosphorylation, Il-8, neutrophil adhesion, ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1	Pelletier et al., Toxicological Sciences: An Official Journal Of The Society Of Toxicology, 69 (1), 210-216 (2002)
	Sodium fluoride (NaF)	Apoptosis	Refsnes et al., Human & Experimental Toxicology, 22 (3), 111-123 (2003)

Bacteria and fungal spores	TNF- α , il-6, il-1 Cytotoxicity : MTT	Huttunen et al., Env Health Perspect, 11 (1), 85-92 (2003)
DEP (pyrene)	Promotor activity, il-8, eotaxin	Bömmel et al., International Immunopharmacology, 3 (10-11), 1371-1379 (2003)
GEP (gasoline engine exhaust particles) and DEP	Il-8	Cheng et al., Chemosphere, 53 (3), 237-243 (2003)
PM2.5	NF- κ B activity, il-8	Nam et al., Toxicology Letters 148, 95-102 (2004)
Monophthalates	Il-6, il-8	Jepsen et al., Toxicology <i>in vitro</i> 18, 265-269 (2004)
Metal-rich welding fumes: NIMROD182, NIMRODc276, COBSTEL 6	Il-8 mRNA and protein, intracellular glutathion, ROS	McNeilly et al., Toxicology And Applied Pharmacology, 196 (1), 95-107 (2004)
Urban Particles: Coarse: 2,5-10 μ m Fine: 0,1-2;5 μ m Ultrafijne: <0,1 μ m) Road PM ₁₀	Il-8 MIP-2	Hetland et al., Toxicology <i>in vitro</i> , 18 (2), 203-212 (2004)
Organic dust	Il-6, il-8	Burvall et al., Life Sciences, 75 (23), 2733-2749 (2004)
DEP	DNA strand breaks (genotoxic effects) and mRNA levels of pro-inflammatory cytokines (il-6)	Dybdahl et al., Mutation Research, 562 (1-2), 119-131 (2004)
NO(2)/hydrocarbon mixture, O3/NO2 mixture	Il-8 mRNA levels	Sexton et al., Inhalation Toxicology, 16 (1), 107-114 (2004)
Cigarette mainstream smoke	Intracellular glutathion	Ritter et al., Inhalation Toxicology, 16 (10), 691-700 (2004)
Ultrafine model particles (hematite, silicasol)	Membrane integrity, il-6, il-8	Wottrich et al., International Journal of Hygiene And Environmental Health, 207 (4), 353-361 (2004)
AM exposed to PM10; A549 exposed to supernatant AM	mRNA of TNF-alpha, il-1 beta, il-8, RANTES, LIF, ICAM-1, MCP-1	Ishii et al., American Journal Of Physiology. Lung Cellular And Molecular Physiology, 287 (1), L176-L183 (2004)
PM10, ultrafine carbon black (ufCB)	C-reactive protein (CRP), Hsp70	Ramage et al., Inhalation Toxicology, 16 (6-7), 447-452 (2004)

		PM2.5	Morphological analysis, ROS, TNF-alpha, il-6	Calcabrini et al., Environmental Research, 95 (1), 82-91 (2004)
		Cigarette smoke	Intracellular iron metabolism	Mayo et al., American Journal of Physiology. Lung Cellular And Molecular Physiology, 286 (4), L866-L876 (2004)
		LPS, TNF-alpha, IL-1 beta, il-8	TGF-β1	Kwong et al., Life Sciences, 74, 2941-2957 (2004)
		Indoor and outdoor dust	Proliferation and mitochondrial activity, TNF-alpha	Mathiesen et al., Environment International, 30(5), 651-657(2004)
		Coal fly ash (CFA)	Il-8	Smith et al., Chemical Research In Toxicology, 13 (2), 118-125 (2000)
		NaF, HF	IL-6, IL-8	Refsnes et al., Human & Experimental Toxicology, 18 (11), 645-652 (1999)
		PM _{10-2.5} PM _{2.5-0.1}	Transcription factors: NF-κB, AP-1, Il-8	HEPMEAP project
Alveolaire macrofagen	THP-1 (cell line)	Ni, Hg, dental material	TNF-alpha	Noda et al, Dental Materials, 19,2, 101-105 (2003)
		Beryllium	Cytokine production (TNF-alpha, il-1 beta)	Galbraith et al., Archives Of Environmental Health, 51 (1), 29-33 (1996)
		Ag, Au, Cu, Hg, Ni	TNF-alpha, il-1 beta	Wataha et al, Denal Materials, 12,5-6, 322-327 (1996) Wataha et al, J Biomedical Materials Research, 45,3,251-257 (1999)
		Fe	TNF-alpha	Scaccabarozzi et al, Br J of Haematology, 110, 4, 978-984 (2000)
		DEP	apoptosis through generation of reactive oxygen radicals (ROR)	Hiura et al., Journal Of Immunology 163, (10), 5582-5591 (1999)
		SP-A (surfactant)	TNF-alpha, il-1 beta, il-8	Song et al, American J Physiology, 279,1,110-117 (2000)
		nanoparticles	TNF-alpha, il-1 beta, il-6, il-10	Chellat et al, Biomaterials 26,9, 961-970 (2005)

	-	Phagocytosis of apoptotic cells, il-8	Kurosaka et al., Cellular Immunology, 211 (1), 1-7 (2001)
	-	Pro-inflammatory cytokines (il-1alpha, il-8, MIF)	Kawagishi et al., Biochimica et Biophysica Acta 1541, 221-230 (2001)
	Diesel exhaust particles (DEP), carbon black (CB), urban air particulates (UP)	HLA-DR	Don Porto Carero et al., Clinical And Experimental Allergy: Journal Of The British Society For Allergy And Clinical Immunology, 32 (2), 296-300 (2002)
	Diesel exhaust particles (DEP), carbon black (CB), urban air particulates (UP)	TNF-alpha, il-1 beta	Don Porto Carero, Ph thesis, 2002
	DEP	Oxidative stress: expression of heme oxygenase 1, activation of the c-Jun N-terminal kinase cascade, il-8 production and induction of cytotoxicity	Li et al., Journal Of Immunology 169 (8), 4531-4541 (2002)
	Organic dust	Il-8	Allermann et al., Environmental Research, 88 (3), 188-198 (2002)
	Monophthalates	Cytokine expression (IL-1b, il-6, il-12a)	Glue et al., Toxicology <i>in vitro</i> , 16 (6), 657-662 (2002)
	DNCB +/- IFN- α , DMSO, SLS, 2-MBT, MS, eugenol, (NH ₄) ₂ 5PtCl ₄ , NiSO ₄ , CoSO ₄ , PPDA	CD86, MHCII internalization	Ashikaga et al., Toxicology <i>in vitro</i> , 16, 711-716 (2002)
	Ozone	Cell viability and cell surface marker expression (CD14, CD11b)	Janic et al., Journal of Immunological Methods, 272 (1-2), 125-134 (2003)
	DNCB, DMSO, SLS, PPD, 2-MBT, methyl salicylate (MS), (NH ₄) ₂ 5PtCl ₄ , NiSO ₄ , CoSO ₄ , CuCl, Tween-80, Aniline, formalin	CD54, CD86, HLA, IL-1 β	Yoshida et al., Toxicology <i>in vitro</i> 17, 221-228 (2003)
	DEP	Microarrays	Verheyen et al., Toxicology <i>in vitro</i> , 18, 377-391 (2004)
	Ozone	CD13, CD14, formyl peptide receptor (FPR)	Klestadt et al., Toxicology <i>in vitro</i> 18, 279-283 (2004)

		Ultrafine model particles (hematite, silicasol)	Membrane integrity, il-6, il-8	Wottrich et al., International Journal of Hygiene And Environmental Health, 207 (4), 353-361 (2004)
		Organic dust	Il-8	Allermann et al., Environmental Research, 88 (3), 188-198 (2002)
	U937 (cell line)	alumina ceramic particles	12 different cytokines (Il-1a, Il-1b, Il-8, Il-10, TNF- α)	Yagil-Kelmer et al., Journal of Orthopaedic Research: Official Publication Of The Orthopaedic Research, 22 (4), 832-838 (2004)
		Organic dust	Il-8	Allermann et al., Environmental Research, 88 (3), 188-198 (2002)
	RAW 264.7 (cell line)	DEP	Proteomics (oxidative stress proteins)	Xiao et al., The Journal Of Biological Chemistry, 278 (50), 50781-50790 (2003)
		DEP	apoptosis through generation of reactive oxygen radicals (ROR)	Hiura et al., Journal Of Immunology 163, (10), 5582-5591 (1999)
		PM _{10-2.5} PM _{2.5-0.1}	Arachidonic acid (AA), il-6	HEPMEAP project
		PM1.0-2.5, PM2.5-10	Il-8, lipid peroxidation products	Huang et al., Environmental Health Perspectives, 111 (4), 478-482 (2003)
		PM 2.5-10, CB	Arachidonic acid (AA), TNF-alpha, il-6	Pozzi et al., Toxicology, 183, 243-254 (2003)
	Mono Mac 6 (cell line)	Carbon black (CB), ultrafine carbon black (UfCB)	Calcium homeostasis	Brown et al., Occupational And Environmental Medicine, 57 (10), 685-691 (2000)
		LPS, TPA (12-tetradecanoyl phorbol 13-acetate)	MCP-1 expression	Steube et al., Leukemia Research, 23, 843-849 (1999)
		LPS, TPA (12-tetradecanoyl phorbol 13-acetate)	Il-8	Steube et al., Cytokine, 12 (8), 1236-1239 (2000)
		Toluene diisocyanate (TDI), Diphenylmethane diisocyanate (DDI), hexamethylene diisocyanate (HDI)	ICAM-1 expression, production hydrogen peroxide	Elms et al., Toxicology <i>in vitro</i> , 15, 631-634 (2001)
		Ultrafine carbon black (ufCB) and CB	ROS	Wilson et al., Toxicology and Applied Pharmacology, 184 (3)172-179 (2002)
		Ultrafine model particles	Membrane integrity, il-6, il-8	Wottrich et al., International Journal of Hygiene And

	(hematite, silicasol)		Environmental Health, 207 (4), 353-361 (2004)
Perifere blood monocytes/ Macrophages (primary cells)	Fine particles (PM _{2.5}), and coarse particles (PM _{10-2.5})	Il-6, il-8	Monn et al., Toxicology and Applied Pharmacology, 155 (3), 245-252 (1999)
	Urban air particels (UAP).	Expression of receptors important for phagocytosis (CD11b, CD11c), gram-negative bacteria (CD14), extracellular matrix interaction (CD29), and immune responses (CD11a, CD54, HLA-DR)	Becker et al., Journal Of Toxicology And Environmental Health, 55 (7), 455-477 (1998)
	DEP-PAHs	Il-8, RANTES, MCP-1	Fahy et al., The Journal Of Allergy And Clinical Immunology, 103 (6), 1115-1124 (1999)
	DEP-PAHs +/- Der p1	mRNA expression of il-8, RANTES, TNF-alpha, MCP-1	Fahy et al., American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology, 23 (2), 247-254 (2000)
	Monophthalates	Cytokine expression (IL-1b, il-6, il-12a)	Glue et al., Toxicology <i>in vitro</i> , 16 (6), 657-662 (2002)
	Ambient particles (coarse and fine)	Free radical generation	Kleinman et al., Toxicology Letters, 137, 151-158 (2003)
	Ultrafine (Uf) particles	ROS, TNF- α (mRNA and protein), intracellular calcium concentration, transcriptipon factors	Brown et al., American Journal Of Physiology. Lung Cellular And Molecular Physiology, 286 (2), L344-L353 (2004)
	PM ₁	Supernatant: induction of adhesion molecule expression on endothelial cells	Kritovich et al., Chem. Res. Toxicol., 17 (10), 1303-1312 (2004)
	alumina ceramic particles	Il-1a, Il-1b, Il-8, Il-10, TNF-α	Yagil-Kelmer et al., Journal of Orthopaedic Research: Official Publication Of The Orthopaedic Research, 22 (4), 832-838 (2004)
	PM 1648	AM apoptosis and necrosis	Obot et al., Inhalation Toxicology, 16 (2), 69-76 (2004)
	Ozone	Cytokines (il-6, il-4, IFN-γ, TFN-alpha) and proliferation index (PI)	Larini et al., Toxicology <i>in vitro</i> 19, 55-61 (2005)
	Indoor and outdoor dust	Proliferation and mitochondrial activity, TNF-alpha	Mathiesen et al., Environment International, 30(5), 651-657 (2004)
Rat alveolar macrophages (primary cells)	DEP, CB, silica	Il-1β, TNF-α	Yang et al., Journal Of Toxicology And Environmental Health. Part A, 58 (5), 261-278 (1999)

		Ambient particles (coarse and fine)	Free radical generation y AM	Kleinman et al., Toxicology Letters, 137, 151-158 (2003)
		Oil fly ash (OFA), diesel dust (DD), and ambient air particles (UAP)	Il-6, TNF- α	Becker et al., Toxicology And Applied Pharmacology, 141 (2), 637-648 (1996)
		Ultrafine (Uf) particles	ROS, TNF- α (mRNA and protein), intracellular calcium concentration, transcriptipon factors	Brown et al., American Journal Of Physiology. Lung Cellular And Molecular Physiology, 286 (2), L344-L353 (2004)
Pulmonary dendritic cells (DC)	MUTZ-3 (cell line)	LPS, TPA (12-tetradecanoyl phorbol 13-acetate)	Il-8	Steube et al., Cytokine, 12 (8), 1236-1239 (2000)
		LPS, TPA (12-tetradecanoyl phorbol 13-acetate)	MCP-1 expression	Steube et al., Leukemia Research, 23, 843-849 (1999)
		GM-CSF, il-4, TNF-alpha	Model for the cytokine-induced differentiation of dendritic cells from CD34 ⁺ precursors, phenotyp: interstitial- or langerhans-like DCs	Masterson et al., Blood, 100 (2), 701-703 (2002)
	KG-1 (cell line)	GM-CSF, TNF-alpha or PMA	Identify intracellular signals and downstream events important in CD34 ⁺ HPC \rightarrow DC differentiation	St. Louis et al., The Journal of Immunology, 162, 3237-3248 (1999)
		Il-18	IFN-gamma	Konishi et al., Journal of Immunological Methods, 209, 187-191 (1997)
		TPA	Il-8 and MCP-1 expression and secretion	Steube et al., Molecular Cell Biology Research Communications, 3 (1), 60-65 (2000)
		Chemical allergens (DNFB, MCI/MI, LPS, SDS, TNF-alpha)	Surface expression: HLA-DR, CD54, CD80 and CD86	Hulette et al., Toxicology and Applied Pharmacology 182, 226-233 (2002)

		-	Expression of receptors (CCR7) and other cell surface molecules (MDR), antigen uptake and migration of unstimulated and activated KG-1 cells with the characteristics of immature and mature DC	Hajas et al., Immunology Letters 92, 97-106 (2004)
	CD34-derived DC (primary cells)	Skin sensitizing and irritating chemicals	-Surface markers: CD86, CD83, HLA-DR -Cytokine production: il-6, il-12- μ array	De Smedt et al., Archives of Dermatological Research, 294 (3), 109-116 (2002)
	Monocyt-derived DC (primary cells)	Skin sensitizing (NiSO ₄ , DNCB, TNBS, Cinn, Eu) and irritating chemicals (SDS)	Surface markers: CD86, CD83, HLA-DR, CD54	Tuschl et al., Toxicology <i>in vitro</i> , 14, 541-549 (2000)
		DEP	Surface markers: CD86, CD83, HLA-DR	Verstraelen et al., Toxicology <i>in vitro</i> , 2005 (accepted)

2.3 Fiches voor geselecteerde tests immuno-respiratoire toxiciteit (IR)

Evaluatiefiche

Naam test: IL-8 productie door A549

Code: IR-1

Eindpunt:			
	Systeemtoxisch en cytotoxiciteit (CS)	X	
	Immuno-respiratoir (IR)		
	Genotoxisch-kankerverwekkend vermogen (GK)		
	Reproductie en endocriene toxiciteit (ER)		

Principe van de test:

Interleukine 8 (IL-8) is een typisch inflammatoir cytokine dat kan vrijgesteld worden door geactiveerde macrofagen en longepitheelcellen na contact met toxische stoffen. Het trekt neutrofielen, eosinofielen en basofielen aan naar de plaats van infectie, waardoor lokaal bepaalde factoren gevormd worden die vasodilatatie veroorzaken. IL-8 wordt geïnduceerd door cytokines zoals $TNF\alpha$ en $IL-1\beta$.

IL-8 wordt geproduceerd door A549 cellen. A549 cellen zijn humane epitheelcellen afkomstig van een longcarcinoom. *In vitro* is het een continue tumorcellijn die adherent is. Deze cellijn wordt aangekocht bij ECACC (European Collection of Animal Cell Cultures, cat.nr. 86012804) of bij ATCC (American Type Culture Collection, cat.nr. CCL-185). Bij het begin van een blootstellingsexperiment, worden de cellen uitgeplaat in 24-well celcultuurplaten in serumvrij medium

IL-8 wordt gemeten in het supernatans na 24h blootstelling via ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Selectie criterium		Waarde⁹	Omschrijving	Referentie
Kosten van uitvoering	KU	7	Testuitvoering ± € 300/staal indien minimum 4 stalen	*
Snelheid van uitvoering	SU	5	Op voorwaarde dat cellijn in cultuur is, anders score 0 -Uitplaten: 24h -Blootstelling: 24h -Elisa: 1dag -Berekening: 4h	*
Respons spectrum en gevoeligheid	RS	7	Respons 78% (14 stoffen getest)	Zie tabel hierna
Standaardprocedure en ringstudies	SR	3	Beschrijving van methode in wetenschappelijke literatuur (>25 ref)	Zie lijst bijlage
Beschikbaarheid testsysteem	BT	7	Cellijnen aanwezig op Vito, bewaring in vloeibare stikstof	*
Relevantie	RE	7		Zie lijst bijlage
Toepassing voor lucht	TL	7		Zie lijst bijlage
Internationale erkenning	IE	5	Test opgenomen in EU project: HEPMEAP	

* vito-ervaring

⁹ OVI: onvoldoende informatie en NVT: niet van toepassing

* schatting op basis van Vito-ervaring

Tabel info ivm responspectrum en gevoeligheid

Groep	Specificaties	Getest (x)	Signaal (+ of -)	Gevoeligheid (LOEC of...)	Referentie
Partikels	Niet-gespecificeerd qua fractie of samenstelling	x	+		Stringer, 1998 Don Porto Carera, 2002 Hetland, 2001 Cheng, 2003
	PM 10	x	+		Jiménez, 2002 Hetland, 2004
	PM 2.5	x	+		Nam, 2004 Hetland, 2004
	PM 1	x	+		Hetland, 2004
	Ultra-fijn stof	x	+		Hetland, 2004 Wottrich, 2004
	Dieselpartikels	x	+		Seagrave, 2000 Don Porto Carera, 2002 Cheng, 2003
	Vliegas	x	+		Stringer, 1998 Seagrave, 2000 Ball, 2000
	Synthetische part. (C-, C/Fe-,...)				
	Andere: ..roet	x	-		Seagrave, 2000 Don Porto Carera, 2002
Extracten van partikels	Niet-gespecificeerd				
	Extract in organisch oplosmiddel (hexaan, dichloormethaan,...)	x	-		Don Porto Carera, 2002
Anorgan. pollutanten	Metalen: katalysatoren (Pt, Pd,...)				
	Andere metalen: Pb, Cd, As, Cr, Sb, Mn, Cu, Zn, Hg, Va, Ni...	x	+		Seagrave, 2000
	Fluoride				
	Asbest	x	+		Tsuda, 1999
Organische pollutanten	PAK's	x	+		Pei, 2002
	PCB's				
	MAK's: Benzeen, toluen, styreen,...				
	Andere: acrylonitrile, butadieen, dichloormethaan, dichloorethaan, formaldehyde, trichloorethyleen, tetrachloorethyleen, vinylchloride,.....				
Andere	Ozon	x	+		Jaspers, 1997, 1998
	monophthalaten	x	ovi		Jepsen, 2004
Totaal +/x getest in %	78%	14	11		

*: testrespons is + of -, of ovi (onvoldoende informatie)

Evaluatiefiche

Naam test: TNF- α productie door THP-1

Code: IR-2

Eindpunt:			
	Systeemtoxisch en cytotoxiciteit (CS)	X	
	Immuno-respiratoir (IR)		
	Genotoxisch-kankerverwekkend vermogen (GK)		
	Reproductie en endocriene toxiciteit (ER)		

Principe van de test:

Tumor necrose factor α (TNF α) wordt voornamelijk geproduceerd door longmacrofagen en monocytten, maar ook longepitheelcellen kunnen dit cytokine genereren. Het veroorzaakt hyper-reactiviteit van de luchtwegen door het aantrekken van inflammatoire cellen of indirect door het genereren van een cascade van cytokines zoals IL-1 en IL-8. Zo speelt TNF α een belangrijke rol bij het tot stand komen van een lokale ontstekingsreactie.

THP-1 cellen zijn humane monocytten afkomstig van het perifere bloed van een persoon met acute leukemie van monocytten. De genetische samenstelling van deze cellen is zo gewijzigd dat ze blijven delen en dus gemakkelijk te kweken zijn. Deze cellijn kan aangekocht worden bij ECACC (cat.nr. 88081201) of bij ATCC (cat.nr. TIB-202). De cellijn is niet adherent, de cellen hechten dus niet vast aan de bodem van de cultuurfles.

Om de THP-1 cellen te differentiëren tot macrofagen, wordt PMA (Phorbol Myristate Acetate) toegevoegd. Na 48 uur incubatie bij 37 °C en 5 % CO₂ zijn de cellen gedifferentieerd van monocytten tot macrofagen en zijn ze vastgehecht aan de bodem van de microtiterplaat

Bij het begin van een blootstellingsexperiment, worden de cellen uitgeplaat in 24-well celcultuurplaten in serumvrij medium. TNF α wordt gemeten in het supernatans na 24h-48h blootstelling via ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Naam test: TNF- α productie door THP-1

Code: IR-2

Selectie criterium		Waarde¹⁰	Omschrijving	Referentie
Kosten van uitvoering	KU	7	Testuitvoering \pm € 300/staal indien minimum 4stalen	*
Snelheid van uitvoering	SU	5	Op voorwaarde dat cellijn in cultuur is, anders score 0 -Uitplaten: 24h -Blootstelling: 24h -Elisa: 1dag -Berekening: 4h	*
Respons spectrum en gevoeligheid	RS	7	75 % (8 stoffen)	Zie tabel hierna
Standaardprocedure en ringstudies	SR	3	Beschrijving van methode in wetenschappelijke literatuur)	
Beschikbaarheid testsysteem	BT	7	Cellijnen aanwezig op Vito, bewaring in vloeibare stikstof	
Relevantie	RE	7		
Toepassing voor lucht	TL	5		
Internationale erkenning	IE	0		

¹⁰ OVI: onvoldoende informatie en NVT: niet van toepassing

* schatting op basis van Vito-ervaring

Naam test: TNF- α productie door THP-1

Code: IR-2

Tabel info ivm responspectrum en gevoeligheid

Groep	Specificaties	Getest (x)	Signaal (+ of -)	Gevoeligheid (LOEC of...)	Referentie
Partikels	Niet-gespecificeerd qua fractie of samenstelling	x	+		Don Porto Careo, 2002
	PM 10				
	PM 2.5				
	PM 1				
	Ultra-fijn stof				
	Dieselpartikels	x	+		Don Porto Careo, 2002
	Vliegas				
	Synthetische part. (C-, C/Fe-,...)				
Andere: ..roet	x	-		Don Porto Careo, 2002	
Extracten van partikels	Niet-gespecificeerd				
	Extract in organisch oplosmiddel (hexaan, dichloormethaan,...)				
Anorgan. pollutanten	Metalen: katalysatoren (Pt, Pd,...)				
	Andere metalen: Pb, Cd, As, Cr, Sb, Mn, Cu, Zn, Hg, Va, Ni...	x	+ (Hg) - (Ni) - (Ag, Au, Cu, Hg) + (Ni) + (Fe)		Noda, 2003 Wataha, 1999 Wataha, 1996 Scaccabarrozzi, 2000
	Fluoride				
	Asbest				
Organische pollutanten	PAK's				
	PCB's				
	MAK's: Benzeen, toluen, styreen,...				
	Andere: acrylonitrile, butadieen, dichloormethaan, dichloorethaan, , vinylchloride,.....				
Andere	Beryllium	x	+		Galbraith, 1996
	Tand materiaal	x	+		Noda, 2003
	Surfactant protein (SP-A)	x	+		Song, 2000
	Nanoparticles	x	-		Chellat, 2005
Totaal +/x getest in %	75%	8	6		

*: testrespons is + of -, of ovi (onvoldoende informatie)

Evaluatiefiche

Naam test: membraan merker expressie in dendritische cellen

Code: IR-3

Eindpunt:			
	Systeemtoxisch en cytotoxiciteit (CS)	X	
	Immuno-respiratoir (IR)		
	Genotoxisch-kankerverwekkend vermogen (GK)		
	Reproductie en endocriene toxiciteit (ER)		

Principe van de test:

De procedure start met navelstrengbloed. Om *in vitro* dendritische cellen (DC) te verkrijgen, vertrekkende van ongedifferentieerde progenitorcellen, kan men vertrekken van twee verschillende celpopulaties: monocyt en CD34⁺-cellen. De CD34⁺ cellen worden geïsoleerd uit navelstrengbloed via magnetische celsortering. Monocyt worden geïsoleerd via adherentie. Deze twee populaties brengen we in kweek en door de geschikte groeifactoren (GM-CSF, il-4, SCF, TNF- α) toe te voegen bekomen we een populatie van immature DC.

Deze cellen worden dan gedurende 24h blootgesteld worden aan teststoffen en als eindpunt wordt gekeken naar de expressie van typische membraanmarkers (fenotypering mbv flowcytometrie).

Naam test: membraan merker expressie in dendritische cellen

Code: IR-3

Selectie criterium		Waarde¹¹	Omschrijving	Referentie
Kosten van uitvoering	KU	3	± € 3000	*
Snelheid van uitvoering	SU	0	21 d	*
Respons spectrum en gevoeligheid	RS	10	100%	Zie tabel hierna
Standaardprocedure en ringstudies	SR	3		
Beschikbaarheid testsysteem	BT	3	Afhankelijkheid van navelstrengbloed of perifere bloed	*
Relevantie	RE	7		Zie tabel bijlage
Toepassing voor lucht	TL	5		
Internationale erkenning	IE	0		

* vito ervaring

¹¹ OVI: onvoldoende informatie en NVT: niet van toepassing

* schatting op basis van Vito-ervaring

Tabel info ivm responspectrum en gevoeligheid

Groep	Specificaties	Getest (x)	Signaal (+ of -)	Gevoeligheid (LOEC of...)	Referentie
Partikels	Niet-gespecificeerd qua fractie of samenstelling				
	PM 10				
	PM 2.5				
	PM 1				
	Ultra-fijn stof				
	Dieselpartikels	x	+		Verstraelen,2004
	Vliegas				
	Synthetische part. (C-, C/Fe-,...)				
	Andere: ..roet				
Extracten van partikels	Niet-gespecificeerd				
	Extract in organisch oplosmiddel (hexaan, dichloormethaan,..)				
Anorgan. pollutanten	Metalen: katalysatoren (Pt, Pd,..)				
	Andere metalen: Pb, Cd, As, Cr, Sb, Mn, Cu, Zn, Hg, Va, Ni...	x	+		De Smedt, 2002
	Fluoride				
	Asbest				
Organische pollutanten	PAK's				
	PCB's	x	+		Niet gepubliceerd
	MAK's: Benzeen, toluen, styreen,...				
	Andere: acrylonitrile, butadieen, dichloormethaan, dichloorethaan, formaldehyde, trichloorethyleen, tetrachloorethyleen, vinylchloride,.....				
Andere	Sensitiserende stoffen: DNCB, OXA, TNBS,	x	+		De Smedt, 2002 Tuschl, 2000
Totaal +/x getest in %	100%	4	4		

Evaluatiefiche

Naam test: cytokine productie (il-6, il-8) door BEAS-2B

Code: IR-4

Eindpunt:			
	Systeemtoxisch en cytotoxiciteit (CS)	X	
	Immuno-respiratoir (IR)		
	Genotoxisch-kankerverwekkend vermogen (GK)		
	Reproductie en endocriene toxiciteit (ER)		

Principe van de test:

Interleukine 8 (IL-8) is een typisch inflammatoir cytokine dat kan vrijgesteld worden door geactiveerde macrofagen en longepitheelcellen na contact met toxische stoffen. Het trekt neutrofielen, eosinofielen en basofielen aan naar de plaats van infectie, waardoor lokaal bepaalde factoren gevormd worden die vasodilatatie veroorzaken. IL-8 wordt geïnduceerd door cytokines zoals $TNF\alpha$ en IL- 1β .

Interleukin-6 (IL-6) is eveneens een inflammatoir cytokine.

IL-8 en IL-6 worden geproduceerd door BEAS-2B cellen. BEAS-2B cellen zijn humane epitheelcellen afkomstig van normaal humaan bronchiaal epitheel, maar geïnfecteerd met adenovirus 12-SV40 hybride en gekloneerd. Het is een continue adherente cellijn die in een monolaag op de bodem van een gecoate cultuurfles groeit. Deze cellijn kan aangekocht worden bij ECACC (cat.nr. 95102433) of bij ATCC (cat.nr. CRL-9609). Bij het begin van een blootstellingsexperiment, worden de cellen uitgeplaat in 24-well celcultuurplaten in serumvrij medium.

IL-8 en il-6 worden gemeten in het supernatans na 24h blootstelling via ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Naam test: cytokine productie (IL-6, IL-8) door BEAS-2B

Code: IR-4

Selectie criterium		Waarde¹²	Omschrijving	Referentie
Kosten van uitvoering	KU	7	Testuitvoering ± € 300/staal/cytokine indien minimum 4 stalen	*
Snelheid van uitvoering	SU	5	Op voorwaarde dat cellijn in cultuur is, anders score 0 -Uitplaten: 24h -Blootstelling: 24h -Elisa: 1dag -Berekening: 4h	*
Respons spectrum en gevoeligheid	RS	10	100% (9 teststoffen)	Zie tabel hierna
Standaardprocedure en ringstudies	SR	3		
Beschikbaarheid testsysteem	BT	7	Cellijnen aanwezig op Vito, bewaring in vloeibare stikstof	
Relevantie	RE	7		Zie lijst bijlage
Toepassing voor lucht	TL	7		Zie lijst bijlage
Internationale erkenning	IE	0		

¹² OVI: onvoldoende informatie en NVT: niet van toepassing

* schatting op basis van Vito-ervaring

Tabel info ivm responspectrum en gevoeligheid

Groep	Specificaties	Getest (x)	Signaal (+ of -)	Gevoeligheid (LOEC of...)	Referentie
Partikels	Niet-gespecificeerd qua fractie of samenstelling	x	- +		Ohtoshi,1998 Kennedy,1998
	PM 10				
	PM 2.5	x	+ +		Huang,2003 Veranth,2004
	PM 1				
	Ultra-fijn stof				
	Dieselpartikels	x	+ +		Takizawa,1999, 2000 Ohtoshi,1998
	Vliegas	x	+ +		Quay,1998 Veronesi,1999
	Synthetische part. (C-, C/Fe,...) Andere: ..roet				
Extracten van partikels	Niet-gespecificeerd	x	+		Kawazaki,2000
	Extract in organisch oplosmiddel (hexaan, dichloormethaan,...)				
Anorgan. pollutanten	Metalen: katalysatoren (Pt, Pd,...)				
	Andere metalen: Pb, Cd, As, Cr, Sb, Mn, Cu, Zn, Hg, Va, Ni...	x	+ +		Samet,1998 Pascal,2004
	Fluoride				
	Asbest				
Organische pollutanten	PAK's				
	PCB's				
	MAK's: Benzeen, toluen, styreen,...				
	Andere: acrylonitrile, butadieen, dichloormethaan, dichloorethaan, formaldehyde, trichloorethyleen, tetrachloorethyleen, vinylchloride,.....				
Andere	Ozon	x	+ -		Mögel,1998 Lang,1998
	TDI	x	+		Lee,2003
	Allergenen:HDM	x	+		King,1998
Totaal +/x getest in %	100%	9	9		

*: testrespons is + of -, of ovi (onvoldoende informatie)

3 BIJLAGE : REPRODUCTIE EN ENDOCRIENE TOXICITEIT

3.1 Vergelijkende tabel met testinformatie voor fiches

<i>In vivo</i> target	<i>In vitro</i> testsysteem	Blootstelling	Eindpunt	Gemeten signaal of gevoeligheid	Referentie
Oestrogeen receptor	hEr-yeast (YES) (John Sumpter, Brunel University)	Positieve controle, 17 β -oestradiol	Oestrogeen activiteit op basis van receptor binding Detectie via absorptie metingen	EC10: 0.30 nM (\pm 0.1)	Routledge & Sumpter, 1996 Van den Belt et al., 2004
	hEr-yeast (YES) (John Sumpter, Brunel University)	DEP (type-1 met 0.05% S & type-2 met 0.02% S): <ul style="list-style-type: none"> • Suspensie totaal DEP • Hexaan extract (3 fractions) • Benzeen extract • Dichloromethaan extract • Methanol extract • Ammonium • HCl 	Oestrogeen activiteit Anti-oestrogeen activiteit door onderdrukking van signaal van positieve controle	Verschillende organische extracten zijn oestrogeen met LOEC tot 5.8.10 ⁻¹² g/l (type 1) & 9.8.10 ⁻⁵ g/l (type 2) anti-oestrogene activiteit in organische extracten, en van ammonium en HCl extracten	Taneda et al. 2002a Taneda et al. 2002b
		Nitrophenols (isolated from DEP): <ul style="list-style-type: none"> • 4-nitrophenol (PNP) • 2-methyl-4-nitrophenol of 4-nitro-o-cresol (PNOC) • 3-methyl-4-nitrophenol of 4-nitro-m-cresol (PNMC) • 4-nitro-3-phenylphenol (PNMPP) 	Oestrogeen activiteit	LOEC PNP: 5.10 ⁻⁴ M PNEC: no significant effect LOEC PNMC: 2.5 10 ⁻⁴ M LOEC PNMPP: 3.9 10 ⁻⁶ M vergelijkend <i>in vivo</i> werk toont in de uterus assay dat PNMC en PNMPP oestrogene potentie hebben	Taneda et al. 2004 Furuta et al. 2004
		Rookgassen (partikels & gasfase) van verbranding van behandeld & niet-behandeld hout, houtskool barbecue, vlees en keukenafval	Oestrogeen activiteit	Tot 230 ng EE2-eq/m ³ Geen verband met gemeten PAK-conc.	Muthumbi et al., 2003

In vivo target	In vitro testsysteem	Blootstelling	Eindpunt	Gemeten signaal of gevoeligheid	Referentie
Oestrogeen receptor		Rookgassen van dennenhout, verbrand bij 600 of 1000°C, en behandeld met Cu-naftenaten en Cu-chloride	Oestrogeen activiteit	Detectie van oestrogeen signaal	Muthumbi et al., 2002
	hEr-yeast (YES) (John Sumpter, Brunel University)	Stadslucht China, PM100, ruwe extracten en fracties	Oestrogeen activiteit	Detectie : 0.2-0.8 µg E2/g PM100 (chemische metingen van fenolderivaten, oxy-PAK's)	Wang et al., 2004
		Verbranding fossiele brandstoffen, ruwe extracten en fracties	Oestrogeen activiteit	Positief signaal, met rangorde relatieve potentie: Petroleum-auto>steenkool-kachel>diesel-landbouwmotor>steenkool-centrale	Wang et al., 2003
	Binding affiniteit (cytosol schaap uterus)	Positieve controle, 17β-oestradiol	Oestrogeen activiteit op basis van receptor binding	EC50: 0.30 nM (±0.05)	Van Lipzig et al., 2005
	Binding affiniteit (cytosol schaap uterus)	B(a)P en chryseen, met gehydroxyleerde metabolieten	Oestrogeen activiteit op basis van receptor binding	EC50 B(a)P=niet actief EC50 OH-B(a)P isomeren= 1-150 µM EC50 chryseen= niet actief EC50 OH-chryseen isomeren 0.6-26 µM	Van Lipzig et al., 2005
	Binding affiniteit (cytosol rat uterus)	Extract dieselpartikels	Oestrogeen activiteit op basis van receptor binding	IC50: 100 ng/µl	Meek, 1998
Bindingstest ERBA (UG)	Industriële chemicaliën, pesticiden en farmaca	Bindingsaffiniteit met geïsoleerde Er	Geen stoffen uit lijst met relevantie voor luchtpollutie	Witters et al., 2002 Dhooge et al., in prep.	

E-screen, MCF-7 proliferatie	Positieve controle, 17 β -oestradiol	Oestrogeen activiteit op basis van receptor binding	EC50: 0.01 nM (\pm 0.004)	Van Lipzig et al., 2005
E-screen, MCF-7 proliferatie	B(a)P en chryseen, met gehydroxyleerde metabolieten	Oestrogeen activiteit op basis van receptor binding	EC50 B(a)P= tox EC50 OH-B(a)P isomeren= effect < 50% EC50 chryseen= niet actief EC50 OH-chryseen isomeren 1-4 μ M	Van Lipzig et al., 2005
Er-CALUX; stabiele transfectie (T47D.Luc of U2-OS Luc)	Positieve controle, 17 β -oestradiol	Er- Receptor transactivatie met Luc-siginaal	LOD: 0.001 nM EC50: 0.02 nM	Meerts et al., 2001 Van Lipzig et al., 2005 Sonnenveld et al. 2004
Er-CALUX; stabiele transfectie (T47D.Luc)	Polybroomdiphenylethers (PBDE), gehydroxyleerde PBDE en polybroombisphenol	Er- Receptor transactivatie met Luc-siginaal	11 isomeren PBDE's LOEC: 0.05-5 μ M 2 isomeren HO-PBDE LOEC 2-20 μ M 3 isomeren Br-bisphenolen LOEC: 2-100 μ M 3 isomeren PBDE's: + sign	Meerts et al., 2001
	B(a)P en chryseen, met gehydroxyleerde metabolieten	Er- Receptor transactivatie met Luc-siginaal	EC50 B(a)P= 9.2 μ M EC50 OH-B(a)P isomeren= 0.04-2 μ M EC50 chryseen= niet actief EC50 OH-chryseen isomeren 0.3-1.7 μ M	Van Lipzig et al., 2005
Er-CALUX; stabiele transfectie (U2-OS Luc)	Industriële chemicaliën, pesticiden en farmaca	Er- Receptor transactivatie met Luc-siginaal	Geen stoffen uit lijst met relevantie luchtpollutie	Sonnenveld et al. 2004

	MCF-7, transiente transfectie Gal4-Luc & ER	Extract dieselpartikels	Er- Receptor transactivatie met Luc- signaal	LOEC= 0.046 ng/μl	Meek, 1998
	MCF-7, transiente transfectie ERE-tk-CAT	PCB's 138, 153, 180	Er- Receptor transactivatie met Luc- signaal	Anti-estrogene activiteit, effect bij 9 μM	Bonefeld- Jorgensen et al. , 2001
	MDA-MB-231, ERE-Luc transiente transfectie	PCB's 138, 153, 180	Er- Receptor transactivatie met Luc- signaal	Anti-estrogene activiteit, effect bij 9 μM	Bonefeld- Jorgensen et al. , 2001

In vivo target	In vitro testsysteem	Blootstelling	Eindpunt	Gemeten signaal of gevoeligheid	Referentie
Androgeen receptor	hAr-yeast (YAR) (John Sumpter, Brunel University)	Positieve controle, 5 α -dihydrotestosterone	Androgeen activiteit op basis van receptor binding Detectie via absorptie metingen		
	hAr-yeast (YAR) (John Sumpter, Brunel University)	Nitrophenols (isolated from DEP): <ul style="list-style-type: none"> • 4-nitrophenol (PNP) • 2-methyl-4-nitrophenol of 4-nitro-o-cresol (PNOC) • 3-methyl-4-nitrophenol of 4-nitro-m-cresol (PNMC) • 4-nitro-3-phenylphenol (PNMPP) • 	Anti-androgeen activiteit	LOEC PNP: 4.9.10 ⁻⁷ M LOEC PNOC: 4.9.10 ⁻⁷ M LOEC PNMC: 4.9.10 ⁻⁷ M LOEC PNMPP: 4.9.10 ⁻⁷ M (toxicity at conc > 10 ⁻⁵ M)	Taneda et al. 2004
	PC3/AR , stabiele transfectie in humane prostaat kanker Cellijn	Positieve controle, 5 α -dihydrotestosterone	Androgeen activiteit op basis van receptor binding, Detectie via luminiscentie	LOD: 0.01nM	Okamura et al. 2004
	PC3/AR , stabiele transfectie in humane prostaat kanker cellijn	DEP-stalen van \neq belasting: <ul style="list-style-type: none"> • lading (0, 50, 75% van max.) • snelheid (20,50,80 km/h) Extracten: filters soniceren in benzeen/ethanol, evaporatie en reconstitutie in ethanol (DEPE)	Androgeen activiteit Anti-androgeen activiteit	Geen androgene activiteit Anti-androgene activiteit, ifv hogere belading, en hogere snelheid Correlatie met Ahr activiteit ifv lading, niet snelheid	Okamura et al. 2004

CHO/hAR, Transiente transfectie hAr en MMTV-LUC	Polyaromatische koolwaterstoffen (PAK)	Androgeen activiteit Anti-androgeen activiteit Verband met Ah- activiteit	IC50 dibenzo (a,h) anthraceen: 0.5 µM IC50 B(a)A: 3.2 µM IC50 B(a)P: 3.9 µM IC50 fluoranthene: 4.6 µM IC50 chrysene: 10.3 µM IC50 dimethylB(a)A: 10.4 µM Geen verband, tenzij de Ah-agonisten met 3 of 4 aromatische ringen ook meest potente anti- androgene effecten hebben	Vinggaard et al., 2000
Ar-CALUX; (U2-OS Luc)	5α-dihydrotestosterone	Androgeen activiteit op basis van receptor transactivatie Detectie via luminiscentie Androgeen activiteit	LOD: 0.004 nM	Sonnenveld et al. 2004
Ar-CALUX; (U2-OS Luc)	Industriële chemicaliën, pesticiden en farmaca	Androgeen activiteit op basis van receptor transactivatie Detectie via luminiscentie Androgeen activiteit	Geen stoffen uit lijst met relevantie luchtpollutie	Sonnenveld et al. 2004

In vivo target	In vitro testsysteem	Blootstelling	Eindpunt	Gemeten signaal of gevoeligheid	Referentie
Schildklier-functie en hormoon	T-screen: T3 afhankelijke proliferatie van rat hypofyse lijn (GH3)	T4, Triac, Tetra (agonist) en DPH (antagonist) Pesticiden : diuron, dimethoaat, malathion,	Proliferatie (in parallel met de affiniteit van stoffen voor de nucleaire thyroid receptor)	EC50 T3: 191 pM (pc) EC50 T4: 654 pM EC50 Triac: 141 pM EC50 Tetra: 2248 pM EC50 DPH: 46 µM Effectrange Fentinchloride 2-1000 nM (hoge conc. Cytotox)	Gutleb et al., 2004
	T4-TTR assay	Sediment extracten	Competitie voor T4-binding met humaan thyroid transporteiwit	Effect!	Houtman et al., 2004
		Polybroomdiphenylethers (PBDE), gehydroxyleerde PBDE en polybroombisphenol	Competitie voor T4-binding met humaan thyroid transporteiwit	Tetrabromobisphenol A met IC50 bij 100 nM & pentabromophenol IC50 bij 12 nM: PBDE's: enkel effect na metabolisatie	Meerts et al., 2000
	TPO –assay: Humane FTC-133 schildklier carcinoomcellen	4-nonylphenol (NP) octyl-methoxycinnamaat (OMC) 4-methylbenzylideen-camphor (4-MBC) in relatie tot blootstelling fyto-estrogenen	Cellen getransfecteerd voor TPO (thyroid peroxidase): Vergelijk met in vivo assay	NP: inhibitie TPO met EC50 57 µM	Schmutzler et al., 2004

In vivo target	In vitro testsysteem	Blootstelling	Eindpunt	Gemeten signaal of gevoeligheid	Referentie
Vrouwelijk reproductie systeem	Maturatie en fertilisatie van oocyten (rund)	PCB-126 PCB-153	In vitro maturatie Celdeling Blastocyst ontwikkeling	LOEC: <ul style="list-style-type: none"> • 100,6 pg/ml PCB-126 • > 84 ng/ml PCB-153 LOEC: <ul style="list-style-type: none"> • 1,006 pg/ml PCB-126 • 84 ng/ml PCB-153 LOEC: <ul style="list-style-type: none"> • 1,006 pg/ml PCB-126 • >84 ng/ml PCB-153 	Krogenaes et al., 1998

In vivo target	In vitro testsysteem	Blootstelling	Eindpunt	Gemeten signaal of gevoeligheid	Referentie
Mannelijk reproductie systeem	Sertoli cellijnen: MSC-1; TTE3	Review: geen info ivm toxiciteitstesting			Rahman & Huhtaniemi, 2004
	Leydig cellijnen: TM3, TG; MA-10, MLTC-1, R2C	Review: geen info ivm toxiciteitstesting			Rahman & Huhtaniemi, 2004

In vivo target	In vitro testsysteem	Blootstelling	Eindpunt	Gemeten signaal of gevoeligheid	Referentie
Embryonale ontwikkeling	CHEST (kippenembryo)	Omgevingslucht: extractie van PM10 (bemonstering: 3 plaatsen, 2 seizoenen in Tsjechië)	Overleving en misvorming	Embryotox elke meetplaats, Hogere embryotoxiciteit in relatie tot hoge PAK in extracten	Binkova et al. , 2003

3.2 Fiches voor geselecteerde tests endocriene toxiciteit (ER)

Evaluatiefiche

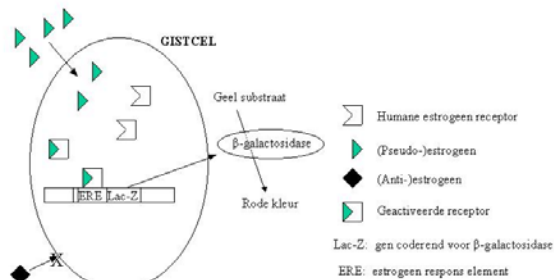
Naam test: Yeast Estrogenic Screen (YES)

Code: ER-1

Eindpunt:		
Systeemtoxisch en cytotoxiciteit (CS)	X	
Immuno-respiratoir (IR)		
Genotoxisch-kankerverwekkend vermogen (GK)		
Reproductie en endocriene toxiciteit (ER)		

Principe van de test:

De gisttest is een test voor het opsporen van endocriene verstoring, waarbij de humane oestrogeen-receptor (hER) ingebouwd werd in bakkersgist, *Saccharomyces cerevisiae* (Genetics Dept., Glaxo).



Een (xeno)-oestrogeen gaat door de celwand en bindt daar met de humane oestrogeen-receptor. Na deze binding dimerizeert het complex. Vervolgens bindt dit complex op het DNA met een zgn. oestrogeen respons element. Door deze binding wordt het lacZ gen geactiveerd dat ervoor zorgt dat het enzyme β -galactosidase wordt geproduceerd. Dit enzyme wordt uitgescheiden in het medium en metaboliseert het chromogeen substraat CPRG (geel) in een rode stof. Er treedt dus een kleuromslag op in het medium van de gist (geel \rightarrow rood). Deze roodkleuring is een maat voor de binding van de onderzochte stof met de oestrogeen-receptor.

Meest relevante referenties:

- Beresford N., Routledge E.J., Harris C.A., Sumpter J.P. (2000). Issues arising when interpreting results from an *in vitro* assay for estrogenic activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 162, 22-33.
- Rehmann K., Schramm K.W., Ketrup A.A. (1999). Applicability of a yeast oestrogen screen for the detection of oestrogen-like activities in environmental samples. *Chemosphere*, 38(14), 3303-3312.
- Routledge E.J., Sumpter J.P. (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(3), 241-248.

Selectie criterium		Waarde¹³	Omschrijving	Referentie
Kosten van uitvoering	KU	10	De kost bedraagt ~250 €	*
Snelheid van uitvoering	SU	5	De testduur bedraagt minimum 4 dagen tot mogelijk 7 dagen	*
Respons spectrum en gevoeligheid	RS	10	zie tabel hierna	zie bijlage
Standaardprocedure en ringstudies	SR	7	Ringstudie is uitgevoerd en standaardprocedure is beschikbaar	Andersen et al., 1999
Beschikbaarheid testsysteem	BT	10	Gist is continu binnen labo beschikbaar, wordt bewaard in diepvries en beperkt onderhoud	*
Relevantie	RE	5	Detectie van oestrogeen versturende activiteit (DEP)	Taneda et al., 2004; Furuta et al., 2004
Toepassing voor lucht	TL	7	5 referenties	Zie bijlage
Internationale erkenning	IE	0	geen	

¹³ OVI: onvoldoende informatie en NVT: niet van toepassing

* schatting op basis van Vito-ervaring

Naam test: Yeast Estrogenic Screen

Code: ER-1

Tabel info ivm responspectrum en gevoeligheid

Groep	Specificaties	Getest (x)	Signaal (+ of -)	Gevoeligheid (LOEC of...)	Referentie
Partikels	Niet-gespecificeerd qua fractie of samenstelling	x	+		Zie tabel bijlage
	PM 10	x	+		Zie tabel bijlage
	PM 2.5				
	PM 1				
	Ultra-fijn stof				
	Dieselpartikels	x	+		Zie tabel bijlage
	Vliegas				
	Synthetische part. (C-, C/Fe-...)				
	Andere: ..rookgassen	x	+		Zie tabel bijlage
Extracten van partikels	Niet-gespecificeerd				
	Extract in organisch oplosmiddel (hexaan, dichloormethaan,...)	x	+		Zie tabel bijlage
Anorgan. pollutanten	Metalen: katalysatoren (Pt, Pd,...)				
	Andere metalen: Pb, Cd, As, Cr, Sb, Mn, Cu, Zn, Hg, Va, Ni...				
	Fluoride				
	Asbest				
Organische pollutanten	PAK's				
	PCB's				
	MAK's: Benzeen, toluen, styreen,...				
	Andere: acrylonitrile, butadieen, dichloormethaan, dichloorethaan, formaldehyde, trichloorethyleen, tetrachloorethyleen, vinylchloride,.....				
Andere	Nitrophenolen				
Totaal +/x getest in %		5	100%		

*: testrespons is + of -, of ovi (onvoldoende informatie)

Evaluatiefiche

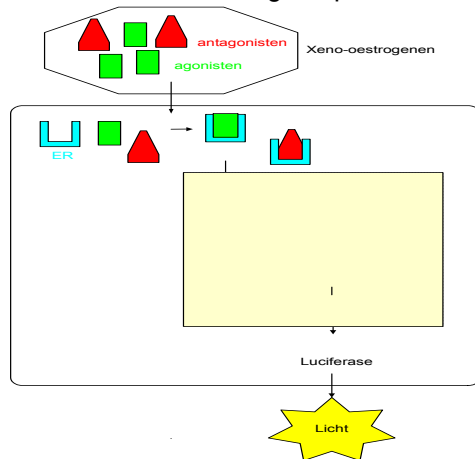
Naam test: ER-reporter activatie test (bv. MVLN/ER-Calux)

Code: ER-2

Eindpunt:			
	Systeemtoxisch en cytotoxiciteit (CS)	X	
	Immuno-respiratoir (IR)		
	Genotoxisch-kankerverwekkend vermogen (GK)		
	Reproductie en endocriene toxiciteit (ER)		

Principe van de test:

Bij de MVLN-test werd er gebruik gemaakt van de MVLN-cel lijn. Dit zijn MCF-7 cellen (humane borstkanker cellen) die stabiel getransfected werden met het pVit-tk-Luc plasmide. Deze lijn werd ontwikkeld door Prof. Pons, INSERM-Montpellier, Frankrijk (Pons *et al.*, 1990; Demirpence *et al.*, 1993). Voor de ER-calux lijn is de gastheercel lijn de T47-D lijn waarin een construct 3xERE-TATA-Luc werd gebracht (Legler *et al.*, 1999). Beide stabiel getransfectede cellijnen bevatten een Estrogen-Responsive-Element (ERE) gekoppeld aan een luciferase reporter gen. Binding van stoffen met een oestrogene potentie aan de oestrogen receptor (ER) leidt tot gen transcriptie o.a. van het luciferase reporter gen, waardoor het luciferase enzym geproduceerd wordt. Wanneer er Luciferase Assay Reagents toegevoegd wordt zal het geproduceerde enzym dit omzetten waardoor er licht vrij komt. Dit licht kan gemeten worden m.b.v. een luminometer en is een maat voor de hoeveelheid stoffen met een oestrogene potentie die aanwezig zijn in het geteste milieumonster.



Meest relevante referenties:

- Demirpence E., Duchesne M.-P., Badia E., Gagne D. and Pons M. (1993). MVLN cells: a bioluminescent MCF-7 derived cell line to study the modulation of estrogenic activity. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 46(3): 355-364.
- Legler J., van den Brink C.E., Brouwer A., Murk A.J., van der Saag P.T., Vethaak A.D. van der Burg B. (1999). Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Toxicol. Sci.* 48(1): 55-66.
- Pons M., Gagne D., Nicolas C.J. and Mehtali M. (1990). A new cellular model of response to estrogens: a bioluminescent test to characterize (anti)estrogen molecules. *Biotechniques* 9: 450-459.

Naam test: ER-reporter activatie test (MVLN/ER-Calux)

Code: ER-2

Selectie criterium		Waarde¹⁴	Omschrijving	Referentie
Kosten van uitvoering	KU	7	~450 €	*
Snelheid van uitvoering	SU	5	5 dagen	*
Respons spectrum en gevoeligheid	RS	5	Niet alle stoffen positief, metabolisatie is cruciaal, interferentie via Ah-receptor	Tabel hierna en overzichtstabel in bijlage
Standaardprocedure en ringstudies	SR	5	Kandidaatattest prevalidatie (voorzien voor 2005, EU-Reprotect)	ICCVAM & ECVAM
Beschikbaarheid testsysteem	BT	7	Onderhoud celcultuur & passages zijn vereist	*
Relevantie	RE	5	Geen directe vgl met <i>in vivo</i> studies, hoewel mechanismen vergelijkbaar zijn	Overzichtstabel in bijlage
Toepassing voor lucht	TL	3	< 3 publikaties lucht, vnl zuivere stoffen	
Internationale erkenning	IE	0	geen	

* Vito-ervaring

¹⁴ OVI: onvoldoende informatie en NVT: niet van toepassing

* schatting op basis van Vito-ervaring

Tabel info ivm responspectrum en gevoeligheid

Groep	Specificaties	Getest (x)	Signaal (+ of -)	Gevoeligheid (LOEC of...)	Referentie
Partikels	Niet-gespecificeerd qua fractie of samenstelling				
	PM 10				
	PM 2.5				
	PM 1				
	Ultra-fijn stof				
	Dieselpartikels				
	Vliegas				
	Synthetische part. (C-, C/Fe-,...)				
Andere: ..					
Extracten van partikels	Niet-gespecificeerd				
	Extract in organisch oplosmiddel (hexaan, dichloormethaan,...)				
Anorgan. pollutanten	Metalen: katalysatoren (Pt, Pd,...)				
	Andere metalen: Pb, Cd, As, Cr, Sb, Mn, Cu, Zn, Hg, Va, Ni...				
	Fluoride				
	Asbest				
Organische pollutanten	PAK's	X	+/-		Zie tabel bijlage
	PCB's	x	+/-		Zie tabel bijlage
	MAK's: Benzeen, toluen, styreen,...				
	Andere: acrylonitrile, butadieen, dichloormethaan, dichloorethaan, formaldehyde, trichloorethyleen, tetrachloorethyleen, vinylchloride,.....				
Andere	Gebromeerde bisphenolen, gebromeerde diphenylethers (PBDE), en gehydroxyleerde PBDE	x	+		Zie tabel bijlage
Totaal +/- getest in %			~ 50%		

*: testrespons is + of -, of ovi (onvoldoende informatie)

Evaluatiefiche

Naam test: T-screen

Code: ER-3

Eindpunt:			
	Systeemtoxisch en cytotoxiciteit (CS)	X	
	Immuno-respiratoir (IR)		
	Genotoxisch-kankerverwekkend vermogen (GK)		
	Reproductie en endocriene toxiciteit (ER)		

Principe van de test:

Onder invloed van T3 wordt de proliferatie van een rat hypofyse lijn (GH-3) gemeten na 96 uur blootstelling in 96-well platen. Interferentie van toxische stoffen op celproliferatie wordt gekwantificeerd met behulp van de Alamar Blue test, door dit te evalueren bij een testreeks in aanwezigheid en afwezigheid van T3 om op die manier het verschil te maken tussen cytotoxiciteit enerzijds en interferentie met T3 functie anderzijds. Zowel agonistische activiteit (verhoogde proliferatie) als antagonistische activiteit (competitie met T3 voor opname in cel) worden gedetecteerd.

Meest relevante referenties:

- Gutleb, A.C., Meerts, H.A.T.M., Bergsma, J.H., Schriks, M., Murk A.J. (2004). T-screen as a tool to identify thyroid hormone receptor active compounds. Environmental Toxicology and Pharmacology, in press.

Naam test: T-screen

Code: ER-3

Selectie criterium		Waarde¹⁵	Omschrijving	Referentie
Kosten van uitvoering	KU	7	~500 €	Schatting op basis van literatuur
Snelheid van uitvoering	SU	5	4-7 dagen	Gutleb et al. 2004
Respons spectrum en gevoeligheid	RS	OVI	Sedimentextracten, met organ. Polluenten: +	Gutleb et al. 2004
Standaardprocedure en ringstudies	SR	3	Enkel publikatie	Gutleb et al. 2004
Beschikbaarheid testsysteem	BT	7	Onderhoud celcultuur & passages zijn vereist	*
Relevantie	RE	3	Niet alle stoffen met <i>in vivo</i> effecten scoren positief	Gutleb et al. 2004
Toepassing voor lucht	TL	0		
Internationale erkenning	IE	0	Nog geen	

¹⁵ OVI: onvoldoende informatie en NVT: niet van toepassing

* schatting op basis van Vito-ervaring

Naam test: T-screen

Code: ER-3

Tabel info ivm responspectrum en gevoeligheid: geen informatie voor testen met zuivere stoffen in onderstaande lijst

Groep	Specificaties	Getest (x)	Signaal (+ of -)	Gevoeligheid (LOEC of...)	Referentie
Partikels	Niet-gespecificeerd qua fractie of samenstelling				
	PM 10				
	PM 2.5				
	PM 1				
	Ultra-fijn stof				
	Dieselpartikels				
	Vliegas				
	Synthetische part. (C-, C/Fe-...)				
Andere: ..					
Extracten van partikels	Niet-gespecificeerd				
	Extract in organisch oplosmiddel (hexaan, dichloormethaan,...)				
Anorgan. pollutanten	Metalen: katalysatoren (Pt, Pd,...)				
	Andere metalen: Pb, Cd, As, Cr, Sb, Mn, Cu, Zn, Hg, Va, Ni...				
	Fluoride				
	Asbest				
Organische pollutanten	PAK's				
	PCB's				
	MAK's: Benzeen, toluen, styreen,...				
	Andere: acrylonitrile, butadieen, dichloormethaan, dichloorethaan, formaldehyde, trichloorethyleen, tetrachloorethyleen, vinylchloride,.....				
Andere	Gebromeerde bisphenolen, gebromeerde diphenylethers (PBDE), en gehydroxyleerde PBDE				
Totaal +/- getest in %		OVI			

*: testrespons is + of -, of ovi (onvoldoende informatie)